

**ZUR CHARAKTERISIERUNG NEUER ISOLATE DES
SEROTYP 0 DES MAUL - UND KLAUENSEUCHEVIRUS**

BARBARA E. KELLER

1986



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Vorstand: Prof.Dr.Dr.h.c.mult.A.Mayr

DES SEROTYPS O DES MAUL- UND KLAUENSEUCHEVIRUS

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Schweinfurt

München 1986

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker

Referent: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Mayr

Korreferent: Prof. Dr. E. Munz

Tag der Promotion: 25. Juli 1986

Meinen Eltern und
meinem Bruder Tommy
gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. EINLEITUNG	1
B. SCHRIFTTUM	2
1. Klassifizierung des MKS-Virus	2
2. Chemisch-physikalische und biologische Eigenschaften des MKS-Virus	2
3. Ausbreitung und Bekämpfung der MKS	4
4. Neutralisierende Antikörper und Immunität	9
5. Methoden zur serologischen und immunologischen Einteilung des MKS-Virus in Typen, Subtypen und Stämme	12
6. Vergleich der Methoden von Neutralisationstest (NT), Komplementbindungsreaktion (KBR) und Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) zur Identifizierung von MKS-Virusstämmen	14
7. Identifizierung von Antigen-Epitopen	17
8. Identifizierung von Virusstämmen anhand biochemischer Merkmale	17
9. Typen und Subtypen des MKS-Virus in verschiedenen geographischen Regionen in den Jahren 1974-1984	19
10. Vergleich von O ₁ -Stämmen des MKS-Virus	32
C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	35
1. Material und Methoden	35
1.1 Material	35
1.1.1 Puffer und Lösungen	35
1.1.2 Medien	37
1.1.3 Virusstämme und Klone	41
1.1.4 Chemikalien und biologische Präparate	42
1.1.5 Labormaterial und Geräte	44
1.1.6 Monoklonale Antikörper gegen den Stamm O ₁ Kaufbeuren	45

1.2	Methoden	45
1.2.1	Zellen	45
1.2.2	Virusproduktion	46
1.2.3	Virusreinigung und Lagerung von gereinigtem Virus	46
1.2.4	Reinigung von radioaktiv markiertem MKS-Virus	49
1.2.5	Gewinnung von Hyperimmunseren und Rekonvaleszentenseren	49
1.2.6	Prüfung der Hyperimmun- und Rekonvaleszentenseren auf Antikomplementarität	50
1.2.7	Gewinnung von Komplement	50
1.2.8	Virustitration im Suspensionsplaquetest	51
1.2.9	Serologische Tests	52
1.2.9.1	Plaquereduktionstest	52
1.2.9.2	Mikro-Neutralisationstest	55
1.2.9.3	Komplementbindungsreaktion	55
1.2.10	Isoelektrofokussierung	58
2.	Ergebnisse	59
2.1	Charakterisierung von Virusstämmen und Virusklonen anhand der Plaquemorphologie	59
2.2	Identifizierung von Virusisolaten des Typs O anhand des Plaquereduktionstests	62
2.2.1	Verwandtschaftsgrad zwischen Stämmen verschiedener Subtypen: O ₁ Kaufbeuren und O ₂ Brescia	62
2.2.2	Vergleich von Virusstämmen mit hohem Verwandtschaftsgrad	63
2.2.3	Vergleich von Virusstämmen mit geringem Verwandtschaftsgrad	65
2.2.4	Serologische Beziehung zwischen O ₁ Lombardei, O ₁ Hannover und O Finistère	66
2.2.5	Bestimmung von Verwandtschaftsgraden anhand von Titer- Differenzen, r-Werten und R-Werten	69
2.2.5.1	Antigenprofile zur Charakterisierung von Virusstämmen der O ₁ Gruppe	77
2.2.5.2	r-Wert-Profile im Vergleich zu Antigenprofilen aus Titer- Differenzen	88
2.2.5.3	Antikörperprofile zur Darstellung der Antikörperspektren von Immunseren	91

2.2.6	Identifizierung eines neuen Virusisolats: O ₁ Zusmarshausen	95
2.2.7	Klone des Virusstamms O ₁ Lausanne	97
2.2.8	Monoklonale Antikörper gegen O ₁ Kaufbeuren	106
2.3	Die Virusstammdifferenzierung mittels Komplement- bindungsreaktion im Vergleich zum Plaquereduktionstest	110
2.4	Die Virusstammdifferenzierung mittels Isoelektrofokussierung	115
D.	BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE	118
E.	ZUSAMMENFASSUNG	126
F.	LITERATURVERZEICHNIS	132

A. EINLEITUNG

Die Maul- und Klauenseuche (MKS) ist eine weltweit auftretende, seuchenhafte Erkrankung, die hauptsächlich bei Rindern und Schweinen vorkommt, jedoch auch Schafe, Ziegen und wildlebende Klautiere befallen kann.

Serologisch und immunologisch lassen sich sieben Typen des MKS-Virus unterscheiden: O, A, C, S.A.T. 1-3 und Asia 1, wobei die Impfung oder Durchseuchung mit einem Typ nicht vor erneuter Infektion mit einem anderen Typ schützt.

Die genannten MKS-Virustypen unterteilen sich weiter in Subtypen, die anhand von Referenzstämmen klassifiziert werden. Die Zuordnung eines Virusisolates zu einem Subtyp kann wegen der gleitenden Übergänge von einem Virusstamm zu einem anderen, wie sie sich im serologischen Test zeigen, schwierig, wenn nicht unmöglich sein. Es ist jedoch von großer Bedeutung, Isolate von aktuellen MKS-Ausbrüchen weltweit zu charakterisieren und zu identifizieren und mit den gebräuchlichen, in den Vakzinen verwendeten Stämmen zu vergleichen.

Die neueren Isolate des Typs O des MKS-Virus werden weitgehend dem Subtyp O₁ zugeordnet, für den der im Jahre 1946 isolierte Stamm O₁Lombardei Referenzstamm ist. Die in der Bundesrepublik Deutschland gebräuchlichen Vakzinen enthalten zwar mit O₁Kaufbeuren, O₁Lausanne und O₁England Stämme des Subtyps O₁, aber es ist nicht gesagt, daß diese O₁-Stämme gegen neu auftretende O-Stämme Rinder ausreichend immunisieren.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, einen Teil der in den letzten Jahren aufgetretenen O-Stämme zu vergleichen und anhand von Kreuzreaktionen zu charakterisieren. Da die Erfahrung gezeigt hat, daß beim Rind eine enge Korrelation zwischen der Höhe des Titers neutralisierender Antikörper und dem Schutz nach experimenteller Infektion besteht, wurde für die Charakterisierung der Virusisolate der Neutralisationstest in Form eines Plaquereduktionstests als Referenzmethode gewählt.

B. SCHRIFTTUM

1. Klassifizierung des Maul- und Klauenseuche-Virus

Das Maul- und Klauenseuche (MKS)-Virus ist ein kubisches, Ribonucleinsäure (RNA) enthaltendes Virus, das mit seinen sieben serologischen und immunologischen Typen das Genus Aphthovirus innerhalb der Familie der Picornaviridae bildet (Cooper et al., 1978).

Es unterscheidet sich von den anderen Genera, Rhinovirus, Enterovirus und Cardiovirus, in mehreren Merkmalen, vor allem in der Dichte, der pH-Stabilität und in der Breite des Wirtsspektrums.

Gemeinsam ist allen Genera, daß sie eine polycistronische RNA besitzen, die als Messenger-RNA fungiert und deren primäres Translationsprodukt ein Polyprotein ist. Dieses Polyprotein wird durch spezifische Spaltung in mehrere funktionale Proteine umgeformt.

Die Reihenfolge dieser Proteine auf dem primären Polyprotein ist in allen Genera der Picornaviridae gleich (Doel et al., 1978; Pérez-Bercoff, 1978; Rekosh, 1977; Rueckert, 1976; Sangar et al., 1980).

2. Chemisch-physikalische und biologische Eigenschaften des MKS-Virus

Das MKS-Virus hat im elektronenmikroskopischen Bild die Form eines Ikosaeders. Der Durchmesser des Virion beträgt ca. 24 nm. Es hat ein Molekulargewicht von $8,6 \times 10^6$ Dalton (d) und sedimentiert mit 146 s. Die Dichte in Caesiumchlorid beträgt $1,43 \text{ g/cm}^3$ (Bachrach & Bresse, 1958; Bachrach, 1968; Cooper et al., 1978; Strohmaier, 1976; Wild & Brown, 1968).

Das Capsid ist aus 32 Capsomeren zusammengesetzt, die insgesamt je 60 Kopien der 4 Capsidproteine enthalten. Diese werden als VP 1-4

bezeichnet, und das Molekulargewicht beträgt für VP1 34.000, VP2 30.000, VP3 26.000 und VP4 13.500 d (Pérez-Bercoff, 1978; Sangar et al., 1980). Das MKS-Virus enthält keine Lipide und ist deshalb resistent gegen Äther- und Chloroformeinwirkung, jedoch nicht gegen Trypsin. Es besitzt eine relativ geringe Wärme- und pH-Resistenz.

Durch Erhitzen auf 56°C für 30 Minuten wird das MKS-Virus vollständig inaktiviert. Die Thermostabilität kann jedoch von Stamm zu Stamm unterschiedlich sein und ist abhängig von der Struktur der Capsidproteine (Ahl, 1967).

Bei pH-Werten unter 6,0 verliert das Virus seine Infektiosität in wenigen Minuten. Es zerfällt dabei in Untereinheiten, die mit 12 s sedimentieren und die gegenüber dem intakten Virus veränderte antigene Eigenschaften besitzen (12 s Antigen) (Cartwright et al., 1982).

Im Laufe der Virusvermehrung werden auch Partikel gebildet, die keine RNA enthalten, jedoch ebenfalls einen Durchmesser von ca. 24 nm aufweisen und mit 75 s sedimentieren. Sie besitzen dieselben antigenen Eigenschaften wie infektiöse, intakte Viruspartikel (Graves et al., 1968; Rweyemamu et al., 1979), enthalten aber anstelle von VP2 und VP4 das sogenannte VP0 mit einem Molekulargewicht von 40.000 d, das Precursorprotein von VP2 und VP4 (Pérez-Bercoff, 1978).

Die RNA des MKS-Virus besitzt die gleiche Polarität wie die Messenger-RNA. Sie ist an ihrem 5'-Ende mit einem virusspezifischen Protein, dem sogenannten VPg, kovalent verknüpft (Grubman, 1980; Sangar et al., 1977). Das Molekulargewicht der RNA beträgt $2,5 \times 10^6$ d.

Die RNA sedimentiert mit 37 s, und die Dichte beträgt ca. 1,7 g/cm³ in CsCl (Bachrach, 1968). Isolierte RNA besitzt einen hohen Grad an Sekundärstruktur (Bachrach et al., 1964). Durch die Einwirkung von UV-Licht wird die Infektiosität der RNA zerstört.

Das MKS-Virus wird im Zytoplasma der infizierten Zelle vermehrt. Bei

einer optimalen Vermehrungstemperatur von 36 bis 37°C dauert der Vermehrungszyklus in Zellkulturen nur ca. 3 Stunden (Rump, 1975; Ahl 1974). Pro Zelle werden dabei einige tausend Viruspartikel gebildet, die aber nur zu etwa 10% infektiös sind (Bachrach et al., 1964).

In Zellkulturen verläuft die Virusvermehrung mit der Ausbildung eines für Picornaviren typischen zytopathischen Effekts.

Neben Primärkulturen von Rind, Schwein, Schaf und Ziege (Nierenzellen, Thyroidzellen, Zungenepithel) sind eine Reihe von Zelllinien geeignet für die Vermehrung des MKS-Virus. Von diesen werden die Zelllinien BHK-21 (Stoker & McPherson, 1964) and IB-RS-2 (de Castro, 1964) am häufigsten verwandt.

3. Ausbreitung und Bekämpfung der MKS

Die MKS ist eine seuchenhafte Erkrankung von Rindern, Schweinen, Schafen, Ziegen und wildlebenden Klauentieren, die große wirtschaftliche Verluste zur Folge haben kann.

Die Infektion durch das MKS-Virus kann durch direkte Übertragung erfolgen, z.B. durch Kontakt im Stall, auf der Weide, auf Viehausstellungen, auf Märkten und bei Viehtransporten, oder indirekt durch Personen, Tiere und unbelebte Vektoren (Rolle & Mayr, 1984).

Bei ca. 50% der durchseuchten Tiere kann das MKS-Virus bis zu mehrere Monate nach Ablauf der Infektion im pharyngealen Bereich nachgewiesen werden (van Bakkum et al., 1959; Burrows et al., 1971; Pereira, 1981; Sellers, 1971; Waldmann, 1930).

Die natürliche Ansteckung mit dem Virus erfolgt meist durch Inhalation oder Ingestion des Agens (Sellers, 1971). Die Inkubationszeit beträgt 2-7 Tage beim Rind, 2-12 Tage beim Schwein und 1-6 Tage beim Schaf (Rolle & Mayr, 1984).

Beim Rind beginnt die Virusausscheidung im Speichel bereits während der Inkubationszeit, und sie erfolgt im Verlauf der Krankheit unter anderem durch Speichel, Nasensekret, Aphthendecken, Aphthenlymphe und Milch.

Die Morbidität beträgt bei der MKS fast 100%, die Mortalität jedoch nur 2-5%; diese kann im Falle eines bösartigen Verlaufs, vor allem bei Jungtieren, auf 50-70% steigen (Rolle & Mayr, 1984).

Das epidemiologische Verhalten der MKS hängt von einer Vielfalt von Faktoren ab, die sowohl das MKS-Virus als auch den Wirt, die geographischen, klimatischen und biologischen Verhältnisse umfassen.

Veränderungen in der Virulenz, die Adaptierung an einen anderen Wirt (z.B. vom Rind an das Schwein) oder eine Änderung in der Tenazität des Virus können das Seuchengeschehen beeinflussen (Pereira, 1981). Durch die Einschleppung "exotischer" Virustypen oder durch die Entstehung eines neuen Virustyps durch Mutation oder genetische Rekombination kann die bestehende Immunität nach Vakzination oder Durchseuchung durchbrochen werden und erneut eine Epizootie in einer Tierpopulation einsetzen. Die Populationsdichte (Hugh-Jones, 1972) und die gleichzeitige Haltung verschiedener Spezies hat in der Verbreitung der MKS eine große Bedeutung, denn obwohl das Rind im Mittelpunkt des Seuchengeschehens steht, können Schafe als Virusreservoir und Schweine als "Infektionsverstärker" fungieren (Sellers & Parker, 1969). Wildlebende Tiere, wie z.B. Füchse, Nager und Fledermäuse können ebenso wie Hunde und Katzen als Vektoren am Seuchengeschehen beteiligt sein (Hyslop, 1970; Sellers, 1971).

Auch Temperatur, Feuchtigkeit, Sonneneinstrahlung, Luftdruck, Niederschlagshäufigkeit und vor allem Windaufkommen und -geschwindigkeit haben einen Einfluß auf die Ausbreitung der MKS (Carton & Vittoz, 1957; Donaldson et al., 1982).

Die MKS ist in der Bundesrepublik Deutschland nach dem Tierseuchengesetz eine anzeigepflichtige Seuche, die besondere Bekämpfungsmaßnahmen erfordert. Dabei ist die schnelle Erkennung

der Krankheit ausschlaggebend für den weiteren Verlauf des Seuchengeschehens.

Im Falle eines Ausbruchs ist im Sperrgebiet der Transport von Klautieren weitgehend untersagt, und auch der Personenverkehr kann Beschränkungen unterworfen sein. Bei der Verwertung von Fleisch, Milch und sonstigen Produkten tierischer Herkunft soll die Verbreitung des Virus durch besondere Verfahren wie Erhitzen und Kochen verhindert werden. Zur Unterstützung der gesetzlich vorgeschriebenen Maßnahmen werden Ring- und Flächenimpfungen mit monovalenten Vakzinen desselben Virustyps oder des frisch isolierten Virusstammes durchgeführt.

Wenn das Risiko besteht, daß es durch wiederholte Einschleppung und Verbreitung des Erregers ständig zu Seuchenausbrüchen kommen kann, ist eine prophylaktische Impfung der gesamten Rinderpopulation mit trivalenter MKS-Vakzine gegen die drei in Europa vorkommenden Typen O, A und C angebracht. (Brooksby, 1981; Rolle & Mayr, 1984; Mohanty & Dutta, 1981; Pereira, 1981). Solche Impfungen werden in der Bundesrepublik seit 1971 durchgeführt.

Die MKS-Vakzinen, die gegenwärtig eingesetzt werden, sind Adsorbat-Vakzinen, für die das Virus entweder nach der von Frenkel (1947) entwickelten Methode in überlebendem Zungenepithel oder in Zellkulturen (Kälbernierzellen, BHK-21-Zellen) produziert wird (Bachrach, 1968).

Zur Inaktivierung des Virus werden heute vor allem Äthylenimin-derivate eingesetzt, die die antigenen Eigenschaften des Virus nicht verändern, während Formaldehyd nur noch in geringem Maße in Gebrauch ist (Strobbe, 1981). Neben Acetyläthylenimin wird vor allem binäres Äthylenimin verwendet (Bahnmann, 1975).

Ein wichtiger Bestandteil der MKS-Vakzine ist das Aluminiumhydroxid, das einmal zur Adsorption des Virus verwendet wird und zum anderen in der fertigen Vakzine als Adjuvans die immunisierende Wirkung des Antigens verstärken soll. Neben Aluminiumhydroxid wird der Vakzine

in der Regel als weiteres Adjuvans noch Saponin zugesetzt. Diese Adjuvantien sind bei Rindern, Schafen und Ziegen gut wirksam.

Ein Nachteil der herkömmlichen MKS-Vakzine besteht darin, daß infektiöses Virus als Ausgangsmaterial verwendet wird und daß das 146 s-Antigen eine relativ geringe Stabilität gegenüber der Einwirkung von Wärme, Proteasen und anderen Faktoren besitzt (Doel & Collen, 1983).

Eine Alternative ist die Herstellung von Vakzinen, die als Antigen nur das isolierte immunologisch wirksame Virusprotein VP1 enthalten (Bachrach et al., 1975; Kleid et al., 1981). Eine Weiterentwicklung in dieser Richtung ist durch die moderne Gentechnologie oder die synthetische Herstellung spezifischer Peptide möglich geworden. Mittels Klonierung der genetischen Information für das Virusprotein VP1 in *E. coli* (Küpper et al., 1981; Kleid et al., 1981) gelang es in den letzten Jahren, VP1 als Fusionsprotein in ausreichender Menge zu isolieren und dieses Protein, gekoppelt an Hämocyanin als Träger, in Vakzinen einzubauen. Mit Zusatz eines geeigneten Adjuvans konnten mit solchen Vakzinen Tiere immunisiert oder zumindest sensibilisiert werden (Bachrach et al., 1976; Hofschneider et al., 1981). Der Gehalt an Antigen ist allerdings mit 100 bis 500 µg Protein pro Impfdosis sehr hoch (Bachrach et al., 1975, 1976; Kleid et al., 1981). Trotzdem war bisher die Immunität ungenügend.

Eine weitere Möglichkeit, nämlich immunologisch wirksame synthetische Peptide in Impfstoffen zu verwenden, wird gegenwärtig erprobt. Voraussetzung dazu war, die Aminosäuresequenzen der Peptidabschnitte zu kennen, die die wirksamen antigenen Determinanten im Virusprotein VP1 enthalten. Wesentlich trugen hierzu die Arbeiten von Strohmaier et al. (1982) bei, aus denen hervorgeht, das VP1-Peptide mit den Aminosäuresequenzen 138 bis 154 und 200 bis 213 Antikörper gegen intaktes Virus induzieren können. Diese Erkenntnisse führten zu Impfversuchen mit entsprechenden synthetischen Vakzinen (Bittle et al., 1982), die zeigten, daß zumindest in Meerschweinchen ein Schutz gegen eine Testinfektion mit MKS-Virus erzielt werden kann. Auch bei diesen Experimenten war eine Koppelung der Peptide

an Trägerproteine und eine hohe Antigendosis (20-200 µg Peptidkonjugat), sowie die Zugabe eines Adjuvans erforderlich (Bittle et al., 1982, 1984).

Der wirksamste Impfstoff gegen die MKS ist die monovalente Vakzine. Allerdings induzieren die verschiedenen MKS-Virustypen einen unterschiedlichen Grad an Immunität. Offensichtlich weist der Virustyp O im Vergleich zu anderen MKS-Typen eine geringere Immunogenität nach der Inaktivierung auf. Auch nach Vakzination mit trivalentem Impfstoff verschwinden die neutralisierenden Antikörper gegen den Serotyp O am schnellsten aus der Blutbahn, ein Phänomen, das bis heute nicht geklärt ist (Wittmann, 1972a).

Die Vakzinen aus inaktiviertem Virus vermögen Rinder gegen MKS zu schützen. Für das Rind ist das MKS-Virus ein besonders wirksames Antigen. Eine Virusmenge von ca. 50 ng reicht bereits zur Immunisierung aus, und eine Menge von 5 ng führt zu einer Sensibilisierung, die bei einer Revakzination zu einem zuverlässigen Impfschutz führt. Die Applikation einer hohen Antigendosis führt aber bei einmaliger Anwendung nicht zu einer ähnlich lang andauernden Immunität, wie sie durch wiederholte Impfung erreicht wird (Black et al., 1984).

Der Impfschutz setzt ca. 8 Tage nach der Impfung ein und ist nach weiteren 8 Tagen deutlich nachweisbar. Der Antikörpertiter steigt im Serum vakzinierter Rinder bis 36 Tage nach der Immunisierung an (Fechner, 1964). Die Dauer der Immunität nach der MKS-Schutzimpfung hängt unter anderem mit dem Alter der geimpften Tiere zusammen. In der Regel werden Rinder erstmals im Alter von 3-4 Monaten geimpft, da bis zu diesem Zeitpunkt die Gegenwart von maternalen MKS-Antikörpern eine aktive Immunisierung verhindert (Wittmann, 1972a; Nicholls et al., 1984). Die Immunisierung hält in der Regel nicht lange an, und meistens erweist sich eine erneute Vakzination nach 3-6 Monaten als nötig. Durch Revakzinierung wird ein Impfschutz erreicht, der über 1 Jahr anhält. Mehrmals jährlich vakzinierter Tiere besitzen in der Regel eine über Jahre bestehende Immunität (Mayr et al., 1984).

Die Immunität ist subtypenspezifisch. Geimpfte Tiere sind demnach gegen eine Infektion mit den in der Vakzine enthaltenen MKS-Subtypen geschützt, halten aber nicht einer Infektion mit anderen Subtypen oder gar Typen stand. Es gibt sogar Abweichungen in der immunologischen Spezifität innerhalb eines Subtyps (Schneider, 1960).

Die Impfung mit herkömmlichen Vakzinen gegen die MKS erweist sich bei Schweinen als weniger wirksam, und eine gute Immunisierung kann nur mit erhöhtem Antigengehalt und geeigneten Adjuvantien erreicht werden. Durch die Impfung mit neu entwickelten MKS-Vakzinen, die durch Acetyläthylenimin inaktiviertes Virus und Mineralöladjuvans oder durch Äthyläthylenimin inaktiviertes Virus mit DEAE-Dextran als Adjuvans enthalten, kann man bei Schweinen einen 3-6 Monate wirksamen Impfschutz erhalten (Wittmann, 1972b).

4. Neutralisierende Antikörper und Immunität

Wegen der Variabilität des MKS-Virus stellt die MKS eine ständige Bedrohung der Schweine- und Rinderpopulation dar. Die Impfung oder Durchseuchung mit einem MKS-Virustyp schützt nicht vor der Infektion mit einem anderen Typ. Beim Rind entwickelt sich eine lokale Immunität bereits 2 Tage nach der Infektion, und nach 5 Tagen sind in der Regel neutralisierende Antikörper in der Blutbahn nachweisbar (Waldmann & Trautwein 1922, 1923). Die "frühen" MKS-Antikörper haben eine Sedimentationskonstante von 19 s (IgM) und besitzen nur geringe komplementbindende Eigenschaften (Röhler & Olechnowitz, 1980). Nach Graves et al. (1964) kommt diesen Antikörpern eine besonders spezifische Wirkung zu. Die "späten" Antikörper treten frühestens 3-4 Tage p.i. auf und erreichen ca. 3 Wochen p.i. ihren höchsten Titer, der bis zu 6 Monaten p.i. konstant bleibt. Diese Antikörper haben eine Sedimentationskonstante von 7 s (IgG) und sind ebenfalls typspezifisch (Graves et al., 1964). Die 19 s-Antikörper besitzen jedoch eine größere Spezifität als die 7 s-Antikörper und können zwischen eng verwandten Virusstämmen unterscheiden. Nach Cowan (1969) besteht der Unterschied zwischen den 7 s und 19 s-Antikörpern in der "antigenic determinant site". Die "antigenic

determinant site", die von 7 s-Antikörpern erfaßt wird, besteht aus mehreren Regionen, von denen jede als eine "antigenic determinant site" für 19 s-Antikörper dient (Röhrer & Olechnowitz, 1980).

Die lokale Immunität hält ca. 6-7 Monate an, neutralisierende Antikörper können jedoch länger als 18 Monate p.i. nachgewiesen werden, wobei der Übergang zwischen dem Zustand absoluter Immunität und dem Zustand vollkommener Empfänglichkeit fließend ist. Muttertiere, die während der Trächtigkeit MKS hatten oder immunisiert wurden, übertragen die Immunität passiv auf Kälber und Ferkel durch die Kolostralmilch (Gluckov, 1964). Dieser Schutz kann bis zu 3 Monaten anhalten (Hedler, 1922).

Ziel vieler wissenschaftlicher Untersuchungen war es, ein Verhältnis zwischen dem Titer neutralisierender Antikörper im Serum vakzinierter Tiere und dem Immunitätsstatus derselben zu ermitteln (van Bekkum, 1959; Hecke & Lorenz, 1960). So befaßten sich Wissenschaftler aus drei südamerikanischen Instituten mit diesem Thema (Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, Unidade de Controle de Vacinas und Servicio de Laboratorios). Für die dort durchgeführten Versuche wurde eine Gesamtzahl von 791 Rindern mit trivalenter Vakzine immunisiert und nach 21 bis 28 Tagen testinfiziert. Die Seren wurden im Virusneutralisationstest in Zellkulturen (BHK-21, Cl 13) getestet. Rinder, die einen Serumtiter von 1:64 oder höher aufwiesen, waren regelmäßig gegen eine Testinfektion mit einem der drei MKS-Typen O, A oder C geschützt. Dieser Befund ist ein weiterer Beweis dafür, daß die Menge der neutralisierenden Antikörper im direkten Zusammenhang mit dem Immunitätsstatus der Rinder steht (Sutmöller & Vieira, 1980).

Solche in-vivo-Versuche sind zwar sehr aufschlußreich, aber meist aus finanziellen und räumlichen Gründen nicht praktikierbar. Deswegen werden schon seit Jahren Meerschweinchen für die Immunitäts- und Vakzineprüfungen verwendet (Mackowiak et al., 1966), obgleich dieses Testsystem auch Mängel aufweist. Eine Untersuchung mit Hilfe des Plaquereduktionstests ergab nämlich, daß Meerschweinchen-Immunseren das MKS-Virus z.T. nur unvollständig neutralisieren, was zur Bildung von Immunkomplexen führt, die sowohl in vivo als auch in vitro noch

infektiös sind (Hardy & Moore, 1981). Das Vorhandensein dieser nicht neutralisierten Antigene wurde durch Zugabe von Anti-Spezies Immunglobulin verdeutlicht (Booth, 1977). Nach Hardy und Moore (1981) könnte es sich dabei um gegen die 12 s-Komponente gerichtete Antikörper handeln, die zwar an das komplette Virion binden, dieses jedoch nicht vollkommen neutralisieren. Solche Immunkomplexe sind für Zellkulturen noch infektiös. Sie führen beim Meerschweinchen nach intradermaler Injektion in die Fußsohle zur Bildung von Aphthen. Bei intrakardialer Applikation werden infektiöse Immunkomplexe jedoch auf dem Wege der Fc-abhängigen oder komplementabhängigen Phagocytose durch Zellen des retikuloendothelialen Systems inaktiviert (Knudsen et al., 1982, 1983). Knudsen et al. (1983) zeigten darüberhinaus, daß bei der Testinfektion in die Fußsohle von Meerschweinchen höhere Antikörpermengen für die passive Immunisierung erforderlich sind als bei einer Testinfektion in das Zungenepithel.

Diese Art der passiven Immunisierung wurde früher bei Rindern angewandt. Da aber die Mindestdosis für einen Immunschutz bei 10 ml pro Zentner Körpergewicht liegt, ist diese Impfung sehr teuer, und sie steht in keinem Verhältnis zur sehr kurzen Immunitätsdauer von ca. 10 Tagen (Graf, 1922; Renner, 1925).

5. Methoden zur serologischen und immunologischen Einteilung des MKS-Virus in Typen, Subtypen und Stämme

Das MKS-Virus wird serologisch und immunologisch in 7 Typen unterteilt: O, A, C, SAT-1, SAT-2, SAT-3 und ASIA 1. Die beiden ersten MKS-Virus-Typen wurden von Vallée und Carré (1922) nach dem Ort des Seuchenausbruches O (Oise) und A (Allemagne) genannt. Der dritte Typ, C, wurde von Waldmann und Trautwein (1926) beschrieben. Drei weitere Typen wurden in Afrika nachgewiesen, die nach ihrer Herkunft SAT-(South African Territories) 1, 2 und 3 genannt wurden (Brooksby, 1952). Der siebte Typ wurde 1954 in Asien isoliert und als Asia 1 klassifiziert (Brooksby & Rogers, 1957). Innerhalb eines MKS-Virustyps lassen sich Virusstämme verschiedenen Subtypen zuordnen. Beim Typ O sind 10 Subtypen bekannt, beim Typ A 30 und beim Typ C 5 Subtypen. Der Typ Asia 1 weist 3 Subtypen auf, bei SAT-1 treten 6, bei SAT-2 3 und bei SAT-3 4 Subtypen auf (Pereira, 1977).

Die Subtypen sind chronologisch nach einem Zahlensystem im Referenzlabor in Pirbright (England) registriert. Innerhalb der Subtypen sind jedoch weitere Unterschiede feststellbar. Sie werden deshalb stets auch nach dem Ort des Seuchenausbruchs benannt; so wird zum Beispiel der 1966 in Kaufbeuren isolierte Virusstamm des Typs O als "O₁Kaufbeuren" bezeichnet.

Die Klassifizierung des MKS-Virus nach Typen und Subtypen wird anhand von Kreuzreaktionen in vivo und mittels serologischer Tests vorgenommen (Pereira, 1977).

Der Kreuzimmunitätstest wird in Rindern oder Meerschweinchen ausgeführt, indem gegen einen Typ, bzw. Subtyp immunisierte Tiere mit einem abweichenden MKS-Virusstamm testinfiziert werden. Die Einteilung nach dieser Methode ist kompliziert, da die Versuchstiere unterschiedlich reagieren und deshalb in großen Gruppen getestet werden müssen, um eine präzise Angabe über die Verwandtschaft der eingesetzten Virusstämme zu ermöglichen (Brooksby, 1982). Dieses Verfahren erschwert nicht nur eine Aussage, es ist auch wesentlich

teurer als die serologischen Tests. Eine gute Übereinstimmung, sowohl mit dem Kreuzimmunitätstest in vivo als auch mit anderen serologischen Methoden ergibt die Komplementbindungsreaktion (KBR) (Traub & Möhlmann, 1946), die als Referenztest allgemein angewandt wird (Crowther, 1978). Andere häufig angewandte serologische Methoden sind der Neutralisationstest in Zellkulturen oder Versuchstieren (Rweyemamu et al., 1978) und der ELISA (Abu El Zein & Crowther, 1978). Als Antigen kann für diese Tests sowohl in Zellkulturen vermehrtes Virus als auch Aphthenmaterial verwendet werden. Immun- bzw. Hyperimmunseren stammen meist von Meerschweinchen oder Rindern.

Die Relation zwischen zwei Antigenen erhält man, indem man den Titer eines Serums mit heterologem Virus durch den Titer eines Serums mit homologem Virus dividiert. Dieser Wert wird numerisch als r-Wert ausgedrückt. Die Verwandtschaft zwischen zwei Virusisolaten und den dazugehörigen Seren läßt sich auch als Kreuzreaktionsprodukt oder R-Wert ausdrücken (Archetti & Horsfall, 1950; Ubertini et al., 1964), der nach folgender Formel berechnet wird: R (in Prozent)

$$= \sqrt{r_1 \times r_2} \times 100.$$

Brooksby (1968) schlug vor, Stämme mit einem R-Wert über 70% demselben Subtyp, Stämme mit Verwandtschaftsgraden zwischen 32 und 70% verschiedenen Subtypen, von 10 bis 32% sehr verschiedenen Subtypen und unter 10% verschiedenen Typen zuzuordnen.

Die R-Werte stellen eine Vergleichsbasis für die serologische Differenzierung der MKS-Typen und Subtypen dar. Diese Methode bringt aber Nachteile wie z.B. eine unübersehbare Anzahl von Subtypen mit sich. Deshalb kam von verschiedenen Wissenschaftlern der Vorschlag, die Einteilung nach R-Werten zu modifizieren oder die Einteilung nach Subtypen anhand sogenannter Referenzstämme vorzunehmen (Anderson et al., 1974; Arrowsmith, 1975; Forman, 1975), was aber wegen der fließenden Übergänge zwischen den verschiedenen Subtypen schwierig ist. Ein anderer Nachteil dieser Einteilung in Subtypen besteht darin, daß bei dieser Methode asymmetrische Relationen zwischen zwei Virusstämmen nicht berücksichtigt werden. Deshalb schlägt Pereira (1977) vor, daß ein

Stamm nur dann einem neuen Subtyp zuzuordnen sei, wenn die hierzu in der KBR ermittelten r -Werte mit allen anderen untersuchten bekannten Stämmen unter 0,25 in beiden Richtungen liegen.

Brooksby (1968) bietet eine weitere Alternative zur Bestimmung von serologischen Beziehungen zwischen zwei Virusstämmen: Liegt der r -Wert zweier Stämme zwischen 0,5 und 1,0 handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um Virusstämme desselben Subtyps, wobei Vakzinen aus dem einen Virusstamm auch gegen den anderen Stamm schützen sollten. Liegt der r -Wert zwischen 0,1 und 0,01, handelt es sich um sehr verschiedene Subtypen, bzw. Typen, und die heterologe Vakzine gewährleistet keinen Schutz gegen den jeweiligen Virusstamm.

6. Vergleich der Methoden von Neutralisationstest (NT), Komplementbindungsreaktion (KBR) und Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) zur Identifizierung von MKS-Virusstämmen

Für den Nachweis und für die Identifizierung von MKS-Virusstämmen stehen mehrere Methoden zur Verfügung. In den letzten Jahren haben sich unter den serologischen Tests besonders der NT, die KBR und der ELISA bewährt. Die Klassifizierung von Virusstämmen erfolgt heutzutage in der Regel mittels KBR (Traub & Möhlmann, 1946), die nach Pereira (1977) eine gute Übereinstimmung mit anderen serologischen Tests und Immunitätstests *in vivo* aufweist.

Um die quantitative KBR durchzuführen, werden Verdünnungen von inaktivierten, spezifischen Antiseren und Antigenen mit einer optimalen Menge Komplement gemischt und bei 37°C inkubiert. Als Indikatorsystem wird als zweites Antigen-Antikörper-System ein hämolytisches System, bestehend aus Hammelerythrozyten und Anti-Hammelerythrozytenserum, zugegeben. Das Ergebnis ist am Grad der Lysis, bzw. der Sedimentation der zugefügten Hammelerythrozyten abzulesen.

Beim Neutralisationstest wird das infektiöse Virus mit Verdünnungen

von homologen oder heterologen Immun- bzw. Hyperimmunseren bei 37°C inkubiert und anschließend in Zellkulturen oder Versuchstieren die restliche, nicht-neutralisierte Infektiosität gemessen. Heutzutage wird der Neutralisationstest fast ausschließlich in Zellkulturen ausgeführt. Als Zellsysteme können alle für MKS-Virus empfänglichen Kulturen verwendet werden, üblicherweise jedoch die Zelllinie BHK-21. Der Neutralisationstest kann in Mikrotiterplatten oder Röhrchen durch Verimpfung auf Zellrasen oder als Plaquereduktionstest durchgeführt werden.

Der ELISA kann als "direkte" oder "indirekte" Methode durchgeführt werden (Abu El Zein & Crowther, 1978). Das Prinzip besteht darin, in Zellkultur vermehrtes, gereinigtes Virusmaterial in Puffer mit hohem pH-Wert an Polyvinyl-Mikrotiterplatten zu absorbieren. Nach Auswaschen von nicht absorbiertem Antigen wird enzym-markiertes Anti-MKS-Virus IgG im direkten bzw. MKS-Hyperimmunserum oder Patientenserum im indirekten Verfahren zugegeben. Nach weiterer Inkubation wird in dem nach der indirekten Methode durchgeführten Testsystem konjugiertes Anti-Spezies-Antiserum beigemischt. Danach wird bei beiden Varianten der Methode das Enzym-Substrat zugegeben und die Intensität des gebildeten Farbstoffs mit einem Spektrophotometer abgelesen (Crowther, 1978).

Wenn die drei beschriebenen serologischen Methoden in Bezug auf Genauigkeit, Spezifität, Sensitivität, Zeitaufwand und andere Faktoren verglichen werden, ergeben sich einige wichtige Unterschiede. Die KBR z.B. ist eine Methode, die einen nur geringen Zeitaufwand erfordert, und sie kann sowohl mit inaktiviertem als auch mit infektiösem Virusmaterial durchgeführt werden. Allerdings benötigt man eine größere Menge Antigen als bei anderen Tests, um eine Reaktion zu ermöglichen. Der Test wird außerdem von eventueller Antikomplementarität sowohl des Serums als auch des Antigens beeinflusst (Rweyemamu et al., 1978). Auch müssen die benötigten Reagenzien genau standardisiert sein, um Schwankungen innerhalb des Systems zu vermeiden. Ein weiterer Nachteil dieser Methode ist es, daß man zur Typen- bzw. Subtypenbestimmung gereinigtes Antigen (Forman, 1974a, b), bzw. 146-s spezifisches Antiserum verwenden

muß. Wenn eine Reaktion mit der 12-s-Komponente des MKS-Virus nicht ausgeschlossen ist, wird eine klare Aussage über Verwandtschaftsgrade verschiedener Stämme erschwert. Forman (1974a, b) zeigte, daß die Beziehung zwischen fixiertem Komplement und reagierendem Antiserum bei konstanter Antigenmenge nicht linear ist, wie z.B. Bradish et al. (1960) gemeint hatten. Er modifizierte die KBR deshalb in der Weise, daß die Serumtiter bei variabler Antigen- und Serummenge in Gegenwart einer konstanten Komplementmenge bestimmt werden.

Die Spezifität der KBR wurde von verschiedenen Wissenschaftlern mit der des NT verglichen, und Rweyemamu et al. (1977) schlagen vor, den Neutralisationstest als Referenztest einzusetzen, da dieser bessere Rückschlüsse auf die Infektion im Tier erlaube. Antiseren rekonvaleszenter Tiere sind weniger spezifisch als die vakzinierter Tiere, was jedoch beim NT, im Gegensatz zur KBR, eine geringere Rolle spielt (Rweyemamu, 1984). Der NT scheint in vielen Fällen das beste in-vitro-System zur Subtypendifferenzierung zu sein, und die mit verschiedener Technik im NT ermittelten antigenen Verwandtschaftsbeziehungen stimmen untereinander gut überein und ergeben ein verlässliches Bild der Variationen innerhalb eines Typs oder Subtyps. Der NT erfüllt darüberhinaus zwei wichtige Voraussetzungen zur Typen- und Subtypendifferenzierung: Er mißt nur die neutralisierenden Antikörper und wird nicht von der Reaktion mit nicht-immunogenen Antigenen (12-s-Komponente, VIA-Antigen) beeinflusst (Rweyemamu, 1984).

Eine hohe Spezifität und eine 50 bis 200-fach höhere Sensitivität gegenüber der KBR beschreibt Crowther (1978) für den ELISA. Versuche, mit der ELISA-Methode 146 s Partikel in Anwesenheit von 12 s Antigen mit Hilfe der IgG-Fraktionen aus Anti-146 s Meer-schweinchenseren zu bestimmen, ergaben, daß mit dem ELISA nur die 146 s Komponente gemessen wird; das 12 s-Antigen reagierte in diesem Fall nicht. Dasselbe trifft auch bei der Verwendung von Rohvirus zu. Ein Vorteil der indirekten Methode ist, daß nur ein einfacher Anti-Spezies-Antikörper mit Enzym konjugiert werden muß.

7. Identifizierung von Antigen-Epitopen

Wie zuvor erörtert, haben Antikörper, die durch das VP1 induziert werden, die Fähigkeit, infektiöses MKS-Virus zu neutralisieren (Bachrach et al. 1975; Laporte et al., 1973; Meloen et al., 1979). Strohmaier et al. (1982) und Bittle et al. (1982) gelang es, die wichtigsten antigenen Abschnitte in der Sequenz des VP1 zu identifizieren. Pfaff et al. (1982) konnten zudem zeigen, daß synthetische Peptide aus diesen Abschnitten in Kaninchen Antikörper induzieren, die in der Lage sind, MKS-Virus im serologischen Test zu binden. Parallel zu diesen Untersuchungen liefen Arbeiten, einzelne antigene Epitope auf der Oberfläche des Viruspartikels mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern zu identifizieren, wobei die Antikörper, die das Virus auch zu neutralisieren vermögen, von besonderem Interesse sind. Ouldrige et al. (1984) konnten mit Hilfe monoklonaler Antikörper allein für den trypsin-sensitiven Bereich des VP1 drei antigene Epitope nachweisen. Die Antikörperreaktion mit zwei dieser Epitope hatte eine Neutralisierung des Virus zur Folge. Allerdings sind die antigenen Epitope, die mit neutralisierenden Antikörpern reagieren, offenbar leicht in ihrer räumlichen Struktur zu verändern, denn sowohl Ouldrige et al. (1984) als auch Meloen et al. (1983) fanden, daß diese Antikörper nicht oder nur schwach mit 12 s Untereinheiten oder mit isoliertem Kapsidprotein VP1 des Virus reagierten. Dagegen fanden de Simone et al. (1983), daß einige monoklonale Antikörper, die Virus neutralisieren konnten, auch mit isoliertem VP1 reagierten. Es ist noch nicht geklärt, wie weit innerhalb des intakten Partikels die Virusproteine VP2 und VP3 einen Einfluß auf die Konfiguration des VP1 und damit auf die serologische Spezifität des Virus nehmen können. Thiel und Strohmaier (1984) isolierten monoklonale Antikörper gegen einen O₁-Stamm, welcher eine Reihe verwandter O₁-Stämme nicht neutralisieren konnte.

8. Identifizierung von Virusstämmen anhand biochemischer Merkmale

Die fortschreitende Entwicklung biochemischer Methoden zur

Charakterisierung des MKS-Virus führte auch zu Versuchen, Virustypen und Subtypen mit Hilfe solcher Methoden zu vergleichen und zu identifizieren. Diese Versuche bezogen sich einerseits auf den Vergleich von Virusproteinen oder Peptiden aus einzelnen Proteinen nach enzymatischer Behandlung, andererseits auf die Charakterisierung von RNA-Bruchstücken nach Ribonuclease-Behandlung der viralen RNA.

Während die Polyacrylamidgelelektrophorese der isolierten Virusproteine wenig Anhaltspunkte für eine Verwandtschaft zwischen Virusisolaten gibt, war es Robson et al. (1980) möglich, mit der Methode der limitierten Proteolyse nach Cleveland et al. (1977) Verwandtschaften zwischen Peptiden der Capsidproteine VP1, VP2 und VP3 nachzuweisen. Auch mit Hilfe der Isoelektrofokussierung radioaktiv markierter Proteine aus gereinigtem Virus oder aus Extrakten infizierter Zellen ist eine weitgehende Charakterisierung von Virusstämmen und ein Vergleich verschiedener MKS-Virusisolate möglich (King & Newmann, 1980; King et al., 1981; MacCahon et al., 1982; Lombard et al., 1982; Costa Giomi et al., 1982). Jedoch erlaubt die Methode nur das Erkennen solcher Veränderungen bzw. Mutationen, die mit Ladungsänderungen in den Proteinen gekoppelt sind. Das heißt, daß nur ein gewisser Prozentsatz von Veränderungen in der Sequenz der Virusproteine erkannt werden kann (King & Newmann, 1980; King et al. 1980).

Von den Methoden zur Charakterisierung der RNA hat sich vor allem die Analyse der RNA-Bruchstücke nach RNase T1-Behandlung in der zweidimensionalen Gelelektrophorese nach de Wachter und Fiers (1972) bewährt. Frisby et al. (1976) wandten die Methoden auf die Analyse von RNA-Bruchstücken aus Picornaviren an. Sie fanden deutliche Unterschiede im "Fingerprinting"-Muster zwischen repräsentativen Virusstämmen aus den Familien der Entero-, Cardio- und Aphthoviren sowie zwischen Typ O- und Typ A-Stämmen des MKS-Virus. King et al. (1981) sowie La Torre et al. (1982) zeigten, daß mittels ein- und zweidimensionaler Analyse der RNase T1-Bruchstücke eine Differenzierung von Virusstämmen möglich ist, die der serologischen Differenzierung überlegen ist.

Ein vollständiger Vergleich von MKS-Virusstämmen wurde jedoch erst über die Synthese und Analyse der komplementären DNA (cDNA) möglich. In jüngster Zeit sind mehrere Arbeiten veröffentlicht worden, in denen die Nucleotidsequenzen der Gene der Strukturproteine verschiedener MKS-Stämme beschrieben werden (Beck et al., 1983a, b; Kleid et al., 1981; Kurz et al., 1981; Makoff et al., 1982; Robertson et al., 1983). Der Vergleich der aus den Nucleotidsequenzen abgeleiteten Aminosäuresequenzen verschiedener Stämme ergab, daß im Virus-Protein VP1 des MKS-Virus zwei variable Regionen enthalten sind (Aminosäure Nr. 40-60 und 130-160), welche die für die serologische und immunologische Spezifität entscheidenden Determinanten tragen (Beck et al., 1983a; Robertson et al., 1983). Eine weitere variable Region wurde im Virusprotein VP3 gefunden (Beck et al., 1983b). Außerdem ließ sich aus der Aminosäuresequenz eine Voraussage über die mögliche sekundäre und tertiäre Struktur der variablen Region 140-160 ableiten (Pfaff et al., 1982). Diese Daten boten die Möglichkeit, von den als Antigen bedeutsamen Abschnitten des VP1 synthetische Peptide herzustellen und deren Wirksamkeit nach der Kopplung an Träger-Substanzen in Vakzinen zu prüfen (Bittle et al., 1982).

9. Typen und Subtypen des MKS-Virus in verschiedenen geographischen Regionen in den Jahren 1974 bis 1984

Die Klassifizierung des MKS-Virus nach Typen und Subtypen wird anhand von Kreuzreaktionen in vivo und mittels serologischer Tests, vor allem der KBR, vorgenommen, und die Subtypen werden chronologisch nach einem Zahlensystem im Referenzlabor in Pirbright registriert (Tabelle 1, Pereira, 1977).

Diese Einteilung bedeutet jedoch nicht, daß die neuen Isolate identisch mit anderen, demselben MKS-Virus-Subtyp zugehörigen Virusstämmen sind.

Tab. 1a - Referenzstämme der MKS-Subtypen

Subtyp	Referenzstamm	Subtyp	Referenzstamm
O ₁	O ₁ Lombardei/46	O ₇	Polen 1/59
O ₂	O ₂ Brescia/47	O ₈	Brasilien 1/60
O ₃	O ₃ Venezuela/50	O ₉	Kenia 102/60
O ₅	Indien 1/62	O ₁₀	Philippinen 2/58
O ₆	O _{VI} (England/24)	O ₁₁	Indonesien 1/62
A ₁	A ₁ Bayern	A ₁₈	A Zulia
A ₂	A ₂ Spanien		(Venezuela)
A ₃	A ₃ Mecklenburg	A ₁₉	A Suipacha
A ₄	A ₄ Hessen oder Westdeutschland/48	A ₂₀	USSR 1/64
A ₅	A ₅ Westerwald/51	A ₂₁	Kenia 3/64
A ₇	A ₇ Griechenland	A ₂₂	Irak 21/64
A ₈	A ₈ Parma	A ₂₃	Kenia 46/55
A ₁₀	A ₁₀ Kemron (Argentinien/61)	A ₂₄	A Cruzeiro (Brasilien/55)
A ₁₁	A _{GB}	A ₂₅	A Argentinien/59
A ₁₂	A ₁₁₉	A ₂₆	A Argentinien/66
A ₁₃	Brasilien 1/58 (Santos)	A ₂₇	A Kolumbien/67
A ₁₄	Spanien 1/59 (Bandujo)	A ₂₈	Polatli
A ₁₅	Thailand 1/60	A ₂₉	A Peru/69
A ₁₆	A Belem (Brasilien/59)	A ₃₀	A Uruguay/68
A ₁₇	A Guarulhos (Brasilien/59)	A ₃₁	A Kolumbien/69
		A ₃₂	A Venezuela/70
C ₁	C _{GC}	C ₄	C Tierra del
C ₂	C ₉₉₇		Fuego/66
C ₃	C Resende (Brasilien/55)	C ₅	Argentinien/69

Tab. 1b - Referenzstämme der MKS-Subtypen

Subtyp	Referenzstamm	Subtyp	Referenzstamm
SAT 1/2	RV 11/37	SAT 3/1	RV 3/34
/3	SWA 1/49	/2	SA 57/59
/4	SR 2/58	/3	Bech 20/61
/5	SA 13/61	/4	Bech 1/65
/6	SWA 40/61		
/7	Israel 4/62	Asia 1/1	Pak 1/54
		/2	Israel 3/63
SAT 2/1	Rho 1/48	/3	Kemron Asia 1
/2	SA 106/59		
/3	Ken 3/57		

In den Tabellen 2-6 wird das Vorkommen bestimmter MKS-Typen in verschiedenen geographischen Regionen dargestellt. Daraus wird ersichtlich, daß bestimmte Typen und Subtypen des MKS-Virus in einem Gebiet über lange Zeit auftreten können. Diese Tabellen wurden mit Hilfe von Informationen aus Pereira (1981), "Information Epizootologique" des O.I.E., Paris, aus den Jahressbänden des O.I.E., aus dem "FMD Commission Report" (1983) und den "Animal Health Yearbooks" der FAO (1974-1983), zusammengestellt. Die Daten aus dem Jahr 1984 stammen aus Telegrammen des O.I.E. und sind nicht immer vollständig.

Tab. 2a - Vorkommen von MKS-Typen in Europa einschl. Türkei (1974- 1984)

	1974	1975	1976	1977	1978	1979	1980	1981	1982	1983	1984
Belgien	O	O	O	-	-	-	-	-	-	-	-
Frankreich	C	O	-	-	C	O	-	O,C	-	-	-
Bundesrepublik Deutschland	C	O	A,C	A,C	C	-	O	-	O	-	A,O
DDR	-	-	C	-O	C	-	(C)		O	-	-
Griechenland	O,A	-	A	A	-	-	-	O	-	-	Asia I
Italien	O,C	O,A,C	C	O,A,C	O,A,C	O,A	A	A,C	-	-	A
Malta	-	O	-	-	A	-	-	-	-	-	-
Niederlande	O	O	-	A	-	-	-	-	-	O	O
Portugal	-	(-)	-	-	-	-	C	C	-	-	A
Spanien	O,C	C	C	C	-	C	C	A,C	A	A	A

Tab. 2b - Vorkommen von MKS-Typen in Europa einschl. Türkei (1974- 1984)

	1974	1975	1976	1977	1978	1979	1980	1981	1982	1983	1984
Schweiz	-	-	-	-	C	-	C	-	-	-	-
Türkei	O, A	O, A	O, A	O, A	O, A	O, A	O, A	O, A	O, A	O, A	
UdSSR	O, A	O, A	O, A	O, A	O, A, C	O, C	(A) O, (C)	O	O	O	O
Österreich	O	O	-	-	-	-	-	O	-	-	-
Dänemark	-	-	-	-	-	-	-	-	O	O	O
United Kingdom	C	-	-	-	-	-	-	O	-	-	-
Jugoslawien	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-

Zeichenerklärung:

- kein MKS-Ausbruch bekannt
- () wahrscheinliches Vorkommen
- k.I. keine Information vorhanden

Tab. 3a - Vorkommen von MKS-Typen im Nahen Osten (1974- 1984)

	1974	1975	1976	1977	1978	1979	1980	1981	1982	1983	1984
Bahrain	-	-	0	-	-	(O)	k.I.	-	-	-	-
Iran	0	O,A	0	O,(A)	O,(A)	O,(A)	0	0	0	O,A Asia 1	
Irak	O,A Asia 1	O,A Asia 1	O,A Asia 1	O,A	O,A	O,A Asia 1	O,A Asia 1	O,A	O,A Asia 1	O,A Asia 1	
Israel	-	0	0	-	(A)	(A)	-	O,A (Asia 1)	-	-	Asia 1
Jordan	0	O,A	0	0	O,A	0	0	0	0	0	
Kuwait	A	A	O,A	O,A	O,A Asia 1	0 Asia 1	0 k.I.	0 Asia 1	O,C	k.I.	
Libanon	O Asia 1	0 (Asia 1)	0	O,A	O,A	O,A	0 k.I.	0 k.I.	0	O,A Asia 1	

Tab. 3b - Vorkommen von MKS-Typen im Nahen Osten (1974- 1984)

	1974	1975	1976	1977	1978	1979	1980	1981	1982	1983	1984
Oman	k.I.	k.I.	(O)	O	O	O	O	O	O, A	O, A	
Saudi Arabien	O, A SAT 1	O, A SAT 1	A	A	O	O	O	O	O, A	O, A	
Syrien	O, A, C	O, A	O, A	O, A	O, A	O, A	O, A	O	O, (A)	O, A	
Arabische Republik											
Yemen	O	O	O, A	O, A	O, A	O, A	O	O	O	O	
Demokr. Republik											
Yemen	O	O	O, A	O, A	O, A	k.I.	k.I.	k.I.	k.I.	k.I.	

Zeichenerklärung siehe Tabelle 2

Tab. 4 - Vorkommen von MKS-Typen in Zentral Asien (1974- 1984)

	1974	1975	1976	1977	1978	1979	1980	1981	1982	1983	1984
Afghanistan	O,C	O,A	O,A	O,A	O,A	O,A	k.I.	O	O	O	
Bangladesh	O	O	O,A	O,A	O,A	O,A,C	O,A,C	O,A	O,A	O,A	
Indien	O,A,C Asia 1	O,A,C Asia 1	O,A,C Asia 1	O,A,C Asia 1	O,A,C Asia 1	O,A,C Asia 1	O,A,C Asia 1	O,A,C Asia 1	O,A,C	O,A,C	
Nepal	O,A	O,A,C	O,A,C	O,A,C	O,A	O,A	O,A	O,A	O,A	O,A	
Pakistan	O Asia 1	O,A,C Asia 1	O,A,C Asia 1	O,A,C Asia 1	O,A	O,A	O,A	(O)	(O)	-	
Sri Lanka	A,C	O,C	O,C	O,C	O,C	O,C	O,C	O,C	O,C	O,C	

Zeichenerklärung siehe Tabelle 2

Tab. 5 - Vorkommen von MKS-Typen in Süd-Amerika (1974- 1984)

	1974	1975	1976	1977	1978	1979	1980	1981	1982	1983	1984
Argentinien	O,A,C	O,A,C	O,A,C	O,A,C	O,A,C	O,A,C	O,A,C	O,A,C	O,A,C	O,A,C	O,A,C
Bolivien	O,A,C	O,A,C	O,A,C	O,A,C	O,A	O,A	O,A	O,A,C	O,A,C	O,A,C	
Brasilien	O,A,C	O,A,C	O,A,C	O,A,C	O,A,C	O,A,C	O,A,C	O,A,C	O,A,C	O,A,C	
Chile	A	-	A,C	O,A,C	C	-	-	-	-	-	0
Kolumbien	O,A	O,A	O,A	O,A	O,A	O,A	O,A	O,A	O,A	O,A	0
Ecuador	O,A	O,A	O,A	O,A	O,A	O,A	O,A	O,A	O,A	O,A	O,A
Paraguay	O,A,C	O,A,C	O,A,C	O,A,C	O,A,C	O,A,C	O,A,C	O,A,C	O,A,C	O,A,C	O,A,C
Peru	O,A	A	O,A	O	O,A	O,A	A,C	O,A,C	(O),A,C	A,C	
Uruguay	O,A,C	O,A,C	O,A,C	O,A,C	O,A,C	O,A	O,A	O,A	O,A	A,C	
Venezuela	O,A	O,A	O,A	O,A	O,A	O,A	O,A	O,A	O,A	O,A	

Zeichenerklärung siehe Tabelle 2

Tab. 6a - Vorkommen von MKS-Typen in Afrika (1974- 1984)

	1974	1975	1976	1977	1978	1979	1980	1981	1982	1983	1984
Algerien	-	-	k.I.	A	A	A	-	-	-	-	-
Ägypten	O, A	O, A	O, A	O, A	O, A	O, A	O, A	(O)	O	O	O
Libyen	O	O	-	O	O	A	-	-	k.I.	-	-
Marokko	O	-	-	A	-	-	-	-	-	A	-
Tunesien	-	O	-	-	-	(A)	(A)	A	A	-	-
Kamerun	-	A	A	k.I.	k.I.	(-)	A, k.I.	O, k.I.	O, k.I.	k.I.	k.I.
Tschad	O, A SAT 1	O, A SAT 1	O, A SAT 1	O, A SAT 1	O, A SAT 1	O, A SAT 1	k.I.	k.I.	k.I.	k.I.	k.I.
Gambia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ghana	O, A SAT 1 SAT 2	O, A SAT 1 SAT 2	O, A SAT 1 SAT 2	O, A SAT 1 SAT 2	O, A SAT 1 SAT 2	O, A SAT 1 SAT 2	O, A SAT 1 SAT 2	C, A SAT 1 SAT 2	-	-	-

Tab. 6b - Vorkommen von MKS-Typen in Afrika (1974- 1984)

	1974	1975	1976	1977	1978	1979	1980	1981	1982	1983	1984
Elfenbein- küste	(O) SAT 2	(O) SAT 2	(O) SAT 1,2	(O) SAT 2	(O) SAT 2	O SAT 2	(A) SAT 2	(O) SAT 2	(O) SAT 2	(O) SAT 1,2	
Mauritanien (-)	SAT 2	SAT 2	SAT 2	SAT 2	SAT 2	SAT 2	K.I.	K.I.	K.I.	-	
Niger	A SAT 2	SAT 2	A SAT 1,2	A SAT 1,2	A SAT 1,2	A SAT 1,2	A SAT 1,2	SAT 2	A K.I.	K.I.	
Nigeria	A SAT 1,2	A SAT 1,2	A SAT 1,2	A SAT 1,2	A SAT 1,2	A SAT 1,2	A SAT 1,2	A SAT 1,2	A SAT 1,2	O,A,C SAT 1,2	
Senegal	-	SAT 2	(SAT 2)	K.I.	K.I.	(SAT 2)	SAT 2	SAT 2	SAT 2	SAT 2	
Ober Volta	SAT 2	SAT 2	SAT 2	SAT 2	SAT 2	SAT 2	-	-	-	-	
Zaire	SAT 2	SAT 2	SAT 2	-	-	SAT 2	-	SAT 2	K.I.	SAT 2 K.I.	
Äthiopien	O,A,C	O,A,C	O,A,C	O,A,C	O,A,C	O,A,C	O,A	O,A,C	O,A	O,A	A
Kenia	O,A,C SAT 1,2	O,A,C SAT 1,2	O,A,C SAT 1,2	O,A,C SAT 1,2	O,A,C SAT 1,2	O,A,C SAT 1,2	O,A,C SAT 1,2	O,A,C SAT 1,2	O,A SAT 1,2	O,A SAT 1,2	O,A SAT 2

Tab. 6c - Vorkommen von MKS-Typen in Afrika (1974- 1984)

	1974	1975	1976	1977	1978	1979	1980	1981	1982	1983	1984
Malawi	O,A SAT 1,2	SAT 2	SAT 2	(-)	(-)	(-)	-	A	A	O	
Ruanda- Burundi	-	-	k.I.	k.I.	k.I.	A	O,A	O,A k.I.	O,A k.I.	O,A k.I.	
Somalia	O	(-)	O	SAT 2	O,A SAT 1,2	O,A SAT 2	O	O	-	-	
Sudan	O,A SAT 1	O,A SAT 1	O,A SAT 1	O,A SAT 1,2	O,A SAT 1,2	O,A SAT 1,2	O,A SAT 1,2	O,A SAT 1,2	O,A SAT 1,2	O,A SAT 1,2	
Tanzania	O,A SAT 1	O,A SAT 2	O,A SAT 2	O,A SAT 1,2	O,A SAT 1,2	O,A SAT 1,2	O,A SAT 1,2	O,A SAT 1,2	O,A SAT 1,2	O,A SAT 1,2	
Uganda	O,A,C SAT 1,2	O,A,C SAT 1,2	O,A(C) SAT 1,2	O,A SAT (1)2	O,A(C) SAT 1,2	O,A(C) SAT 1,2	k.I.	k.I.	k.I.	O,A,Asia 1 SAT 1,2,3	
Angola	O,A,C SAT 1,2	O,A,C SAT 1,2	O,A,C SAT 1,2	O,A,C SAT 1,2	-	(-)	-	-	-	k.I.	
Botswana	-	-	-	SAT 1,2	SAT 1,2	SAT 1,2	SAT 2	(SAT 2)	-	-	
Mozambique	O SAT 1,2,3	SAT 1	SAT 1	SAT 1,2	SAT 1,2	SAT 1,2,3	SAT 1,2	O SAT 1,2,3	O SAT 1,2,3	SAT 2,3	SAT 2

Wie aus den Tabellen hervorgeht, kommen in Europa, bis auf eine Ausnahme (Asia 1, Griechenland, 1984), nur die MKS-Typen O, A und in geringerem Maße C vor. Der MKS-Typ O wurde in der UdSSR und Türkei ebenso wie in der Bundesrepublik Deutschland, der DDR, Österreich, Dänemark und England überwiegend als Subtyp O₁ klassifiziert. In der UdSSR und Türkei tritt der MKS-Typ A fast ausschließlich als Subtyp A₂₂ auf. Auch der Subtyp A₅ wurde in Europa in den letzten Jahren vermehrt angetroffen. So sind die MKS-Ausbrüche in Portugal (1983), Bundesrepublik Deutschland (1984), Spanien (1981 und 1983), und Italien (1984) dem Subtyp A₅ zuzuordnen.

Im Nahen Osten kommt der Subtyp A₂₂ am häufigsten vor (FMD Comission Report, 1983). Dieses Gebiet gilt seit 1970, als der Typ SAT 1 zum letzten Mal isoliert wurde, als SAT 1 frei. Diese Tatsache ist vor allem für europäische Länder von großer Bedeutung, da dieser "exotische" MKS-Typ die durch Vakzination gegen Typen A, O und C erzeugte Immunität in einer Rinderpopulation jederzeit durchbrechen kann. Auch der Typ C ist in diesem Gebiet seit 1959, als er in Jordanien, Libanon und Syrien auftrat, nicht wieder isoliert worden (Pereira, 1981). In den letzten Jahren ist auch der Typ Asia 1 im Nahen Osten aufgetreten.

In Asien sind die von 1976 bis 1980 aufgetretenen Ausbrüche zu 43% dem Typ O, zu 18% dem Typ A, zu 12% dem Typ C und zu 27% dem Typ Asia 1 zuzuordnen (Pereira, 1981).

In Afrika ist das Vorkommen der einzelnen MKS-Typen auf bestimmte Regionen beschränkt. So kommt z.B. der Typ O vor allem im Norden und Osten, der Typ A, insbesondere A₅ und A₂₄ (Arrowsmith, 1982), in West-, Zentral- und Ostafrika vor. Die Typen SAT 1 und SAT 2 sind weit verbreitet, treten aber selten im Norden auf, und der Typ SAT 3 ist hauptsächlich im Süden des Kontinents für MKS-Ausbrüche verantwortlich.

In Süd-Amerika sind in den letzten Jahren vor allem die Subtypen A₂₄ und A₃₂, außerdem der Stamm A/81 in Rio Grande do Sul (Brasilien)

und in Argentinien, sowie A/79 in Argentinien und Brasilien isoliert worden. Der Subtyp A/79 weist eine Ähnlichkeit mit dem in Europa zur Vakzineherstellung verwendeten Subtyp A₅Allier auf, so daß bis zu einem gewissen Grade eine Immunität gegen diesen exotischen MKS-Subtyp vorhanden ist. Dagegen würde die Einschleppung des Subtyps A/81 nach Europa eine große Gefahr darstellen, da Untersuchungen im CPFA in Rio de Janeiro (Casas Olascoaga, CPFA, 1984) einen r-Wert zu A₅Allier von 0,06 ergaben. In Chile ist die MKS seit 1979 zum erstenmal wieder 1984 auftreten ("Animal Health Yearbook", Information des O.I.E., 1984). In Argentinien sind in den letzten Jahren die MKS-Typen O, A und in geringerem Maße auch C isoliert worden (Pereira, 1981). Der Typ C tritt in Süd-Amerika meistens als Subtyp C₃ auf. Er kommt in Kolumbien seit 1968 nicht mehr vor und ist noch nie in Venezuela und Ecuador für einen Ausbruch verantwortlich gewesen (Pereira, 1981; "Animal Health Yearbook", 1980-1984). Das "Centro Panamericano de Fiebre Aftosa" berichtet für den Typ O eine weitgehende Uniformität, da in den letzten Jahren ausschließlich der Subtyp O₁ isoliert wurde.

10. Vergleich von O₁-Stämmen des MKS-Virus

In den letzten Jahren konnte man Isolate aus MKS-Ausbrüchen, die durch ein MKS-Typ O-Virus hervorgerufen wurden, weitgehend dem Subtyp O₁ zuordnen, für den der im Jahre 1946 isolierte Stamm O₁-Lombardei als Referenzstamm gilt. Daher werden zur Vakzineproduktion in vielen Ländern ausschließlich O₁-Stämme verwendet. So wird z.B. in Süd-Amerika sowohl in Argentinien, Brasilien und Kolumbien als auch in Paraguay, Uruguay und Venezuela der im Jahre 1958 in Rio de Janeiro isolierte O₁Campos eingesetzt. In Ecuador und Peru wird mit O₁Urubamba ebenfalls ein O₁-Stamm angewandt.

Die im Nahen Osten isolierten O-Stämme weisen untereinander bis auf O Israel keine bemerkenswerten Unterschiede auf (Lombard, 1983). Auch in Europa waren O₁-Stämme für vereinzelte Ausbrüche und große Seuchenzüge verantwortlich (Arrowsmith, 1982; Arrowsmith & Hedger,

1982), so der 1964 isolierte O₁Spanien. Während der Zeit zwischen 1965 und 1967 fand der letzte große Seuchenzug in Westeuropa statt. Das Virus wurde in der Schweiz erstmalig 1965 in Brent isoliert und als O₁ klassifiziert. Da in den folgenden Fällen in der Regel Schweine zuerst erkrankten, und diese mit Speiseresten aus Hotelküchen gefüttert worden waren, könnte der Infektionsstoff auf diese Weise eingeschleppt worden sein. Die in diesen Fällen beobachtete verlängerte Inkubationszeit bis zu 16 Tagen und der erhöhte Personalkontakt und Tierverkehr begünstigten die Ausbreitung der Seuche. So kam der Erreger über Deutschland nach Frankreich und England (Nabholz, 1966). Aus dieser Epizootie stammen Isolate wie O₁Brent, O₁Lausanne, O₁Kaufbeuren, O₁Burgsteinfurt und O₁BFS 1860.

Der 1981 in Griechenland isolierte O₁Stamm (O₁Griechenland) zeigte große Ähnlichkeit mit dem im Jahre 1972 aufgetretenen O Sharquia.

Eine weitere antigenetisch verwandte Gruppe bilden der 1982 in der DDR isolierte O₁Murchin und der 1982 in Dänemark isolierte O₁Dänemark, welche eine starke Ähnlichkeit mit Isolaten aus den 60er Jahren aufweisen. Dasselbe gilt für zwei O₁Isolate aus Groß-Britannien und den Kanalinseln, die dort 1981 auftraten (King et al., 1981; Rweyemamu & Ouldrige, 1982). O Wuppertal (1982) und O Austria (1982) verursachten lokal begrenzte Ausbrüche, wurden aber nicht dem Subtyp O₁ zugeordnet, da sie von den O₁Isolaten aus früheren Ausbrüchen stark abweichen. So zeigte O Wuppertal in der KBR einen hohen r-Wert im Vergleich zu O-Stämmen aus dem Nahen Osten, O Manisa, Türkei/1969 (r = 0,88) und O Sharquia Egypt/1972 (r = 0,70) (Lombard, 1983). Im Jahre 1983 wurde auf der Insel Fünen ein weiterer O₁-Stamm isoliert (O₁Fyn '83), der jedoch mit O₁Dänemark '82 keine bilaterale Verwandtschaft aufweist (Danish Veterinary Service Report, 1983).

Für die Charakterisierung eines MKS-Virusisolates ist es demnach von großer Bedeutung, dieses mit möglichst vielen und für frühere Ausbrüche typischen Isolaten desselben Typs bzw. Subtyps zu

vergleichen, um auf der Basis der Verwandtschaftsgrade auf eine mögliche Einschleppung exotischer MKS-Subtypen, Erkrankungen durch nicht vollständig inaktivierte Vakzinestämme oder Mutationen einheimischer MKS-Stämme schließen zu können.

C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

1. Material und Methoden

1.1 Material

1.1.1 Puffer und Lösungen

Die Rezepte der in den Versuchen verwendeten Lösungen lauten wie folgt:

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), pH 7,4

	mg/l
NaCl	8000
KCl	200
Na ₂ PO ₄	1120
KH ₂ PO ₄	200
CaCl ₂	100
MgCl ₂ ·6H ₂ O	100

PBS-T

Phosphatgepufferte Salzlösung mit 2,5 g Trypsinpulver (Difco)/Liter

0,15 M NaCl-Phosphatpuffer (NaClP-Puffer) pH 7,6

	mg/l
NaCl	8770
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	828
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	7832

Veronalgepufferte Salzlösung mit Gelatinezusatz (KBR-Puffer)

Lösung A:

In 800 ml Aqua bidest. lösen

NaCl 41650 mg

5,5 Diäthylbarbitursäure Natriumsalz

(Barbital-Natrium)

1500

MgCl₂·6H₂O

500

CaCl₂·H₂O

100

In 200 ml heißem Aqua bidest. lösen

5,5 Diäthylbarbitursäure
(Barbital)

2300 mg

Nach Erkalten zu der ersten Lösung zugeben und steriltr filtrieren.

Lösung B:

Aqua bidest. 1600 ml

Gelatine 200 mg

Im Dampftopf 25 Minuten lösen

Der Puffer wird hergestellt aus:

1 Teil Lösung A

4 Teile Lösung B

Witte'sche Lösung

Borsäure reinst 2000 mg

Kaliumsulfat reinst 5000 mg

Aqua bidest 50 ml

Alsevers Lösung, modifiziert nach Wittmann, pH 6,1

mg/l

Dextrose 2050

Na-Citrat 800

NaCl 420

Zitronensäure 55

im Autoklaven 20 Minuten sterilisieren

NETS-Puffer, pH 7,4

0,15 M NaCl

0,05 M Tris HCl

5 mmol EDTA

0,5% NP-40

50% PEG-6000-Lösung in 0,1 M Tris, pH 7,5 (PEG in Tris)

Tris 12114 mg

1 M HCl 84 ml

Aqua bidest. ad 1000 ml, darin lösen

1000 g PEG-6000, 1 Stunde bei 110°C autoklavieren.

Lysis-Puffer, pH 7,4

10 mmol Tris HCl

1 mmol EDTA

1% NP-40

0,1 mg/l Pankreatische RNase

1.1.2 Medien

Alle Medien für Zellkulturen enthalten 100 i.E. Penicillin und 0,1 mg Streptomycin pro ml.

Glasgow Modifikation von Eagles Medium

Anorganische Salze:	mg/l
NaCl	6400,0
KCl	400,0
CaCl ₂ ·2H ₂ O	264,9
MgSO ₄ ·7H ₂ O	200,0
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	140,0
Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O	0,1
Aminosäuren:	
L-Arginin-HCl	42,1
L-Cystin, Na-Salz	28,4
L-Glutamin	584,6
L-Histidin-HCl	21,0
L-Isoleucin	52,5
L-Leucin	52,5
L-Lysin-HCl	73,1
L-Methionin	14,9
L-Phenylalanin	33,0
L-Threonin	47,6
L-Tyrosin	36,2
L-Valin	46,9

Vitamine:

D-Ca-Pantothenat	2,0
Cholinchlorid	2,0
Folsäure	2,0

i-Inosit	4,0
Nicotinamid	2,0
Pyridoxal	2,0
Riboflavin	0,2
Thiamin	2,0

Sonstige Bestandteile

Glucose	4500,0
Phenolrot	17,0

Eagle-Basalmedium mit Zusätzen

	mg/l
NaCl	6400,0
KCl	400,0
CaCl ₂	200,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	200,0
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	140,0
NaHCO ₃	2760,0
Glucose	4500,0
Tryptose-Phosphat	2960,0
Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O	0,1
i-Inosit	4,0
Aminosäurenmischung (MEM, 100fach konzentriert, von Serva)	10,0 ml/l
Glutamin	0,585
Phenolrot	16,0 mg/l
Vitamine (MEM, Vitamine Lösung, 100fach konzentriert, von Serva)	20,0 ml/l

Medium PM-13 (Serva)

Anorganische Salze:	mg/l
CaCl ₂	200,0
KCl	400,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	200,0
NaCl	7200,0
NaHCO ₃	2200,0
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	111,0

Vitamine:

Biotin	0,24
Cholinchlorid	0,14
Folsäure	0,44
Nicotinamid	0,12
Pyridoxal. HCl	0,20
Riboflavin	0,04
Thiamin. HCl	0,35

Andere Komponenten:

Glucose	4500,0
Glutamin	50,0
Hefeextrakt	100,0
Lactalbuminhydrolysat	5000,0
Phenolrot	16,0

Eagles Minimum essential medium (MEM)

Anorganische Salze:

	mg/l
NaCl	6800,0
KCl	400,0
CaCl ₂	200,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	200,0
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	140,0
NaHCO ₃	2200,0

Aminosäuren:

L-Arginin	126,0
L-Cystin	24,0
L-Glutamin	292,0
L-Histidin. HCl	42,0
L-Isoleucin	52,5
L-Leucin	52,5
L-Lysin. HCl	73,0
L-Methionin	15,0
L-Phenylalanin	32,0
L-Threonin	48,0
L-Tryptophan	10,0

L-Tyrosin	36,0
L-Valin	46,0

Vitamine:

Cholinchlorid	1,0
Folsäure	1,0
i-Inosit	2,0
Nicotinamid	1,0
Pantothensäure Ca-Salz	1,0
Pyridoxal. HCl	1,0
Riboflavin	0,1
Thiamin. HCl	1,0

Andere Komponenten:	1000,0
Phenolrot	10,0

Earle'sche Lösung, pH 7,7 bis 8,0

	mg/l
NaCl	6800,0
KCl	400,0
CaCl ₂	200,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	200,0
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	125,0
NaHCO ₃	2200,0
Glucose	1000,0

Earle'sche Salzlösung, doppelt konzentriert,
mit Zusätzen

	mg/l
NaCl	13600,0
KCl	800,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	400,0
CaCl ₂	400,0
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	250,0
NaHCO ₃	2200,0
Glucose	2000,0
Lactalbuminhydrolysat	10000,0
Rinderserumalbumin	2000,0
Hefeextrakt	2000,0

Earle'sche Salzlösung mit Zusatz von HEPES und
Rinderserumalbumin

Earle'sche Salzlösung	1000,0 ml
HEPES	3813,0 mg
Rinderserumalbumin	1000,0 mg

1.1.3 Virusstämme und Klone

Die untersuchten Virusstämme stammen aus den Jahren 1946 bis 1984, die Klone aus verschiedenen Plaqueisolaten des Stammes O₁Lausanne. Zur Charakterisierung ist die relative Plaquegröße der einzelnen Isolate aufgeführt (SP = small plaque, MP = medium plaque, LP = large plaque).

<u>Virusstamm</u>	<u>Jahr der Isolierung</u>	<u>Plaquegröße</u>
O ₁ Lombardei	1946	LP
O Finistère	1957	LP
O Hannover	1960	LP
O Spanien	1964	LP
O ₁ Brent	1965	LP
O ₁ Basel	1965	LP
(Kulturpassage von O ₁ Brent)		

<u>Virusstamm</u>	<u>Jahr der Isolierung</u>	<u>Plaquegröße</u>
O ₁ Kaufbeuren	1966	LP
O ₁ Burgsteinfurt	1966	LP
O ₁ England	1967	SP
O ₁ BFS 1860	1967	SP
O ₁ Lyon	1967	SP
(Lausanne aus Lyon)		
O ₁ Murchin	1982	LP
O ₁ Dänemark	1982	LP
O ₁ Fyn	1983	MP
O Israel	1981	SP
O Austria	1981	LP
O Wuppertal	1982	LP
O ₁ Zusmarshausen	1984	LP

Klone aus dem Virusstamm O₁ Lausanne:

O ₁ Lausanne-Lyon, Cl 165	LP
O ₁ Lausanne-Lyon, Cl 240	LP
O ₁ Lausanne-Lyon, Cl 248	SP
O ₁ Lausanne-Lyon, Cl 249	LP
O ₁ Lausanne, Cl 197	SP
O ₁ Lausanne, Cl 199	LP
O ₁ Lausanne, Rd 696	LP
O ₁ Lausanne, Rd 696, Cl 191	SP
O ₁ Lausanne, '65	LP
O ₁ Lausanne, '65, Cl 226	LP

1.1.4 Chemikalien und biologische Präparate

Acrylamid 2 x krist.	Serva, Heidelberg
(C ₃ H ₅ NO) (M = 71,1)	
Agarose-Pure Powder	Seakem (ME), Marine Colloids, Rockland, Maine, USA

Ambozeptor - Kaninchen-	bio Merieux,
Anti-Hammelerythrozyten-	Nürtingen
serum	
Ammoniumperoxodisulfat	Merck, Darmstadt
$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	
Arcton - 1,1,2, Trichlor-	Serva, Heidelberg
fluoräthan ($\text{C}_2\text{Cl}_3\text{F}_3$) (M = 187,4)	
Äthylendiamin	Serva, Heidelberg
Bis - N,N'Methylenbisacrylamid	Serva, Heidelberg
$(\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2)$ (M = 154,2)	
EDTA - Ethylendiamin-	Serva, Heidelberg
tetraessigsäure p.A.	
Coomassieblau-R	Serva, Heidelberg
Eisessig	Serva, Heidelberg
Freundsches Adjuvans, komplett	Difco, Detroit, USA
Harnstoff p.A.	Serva Heidelberg
HEPES - N-2 Hydroxyethyl-	Serva Heidelberg
piperazin-2-ethansulfonsäure	
Methanol	Serva Heidelberg
Pansorbin	Biorad, München
Penicillin	Grünenthal, Stollberg
Polyacrylamid	Serva, Heidelberg
Polyethylenglykol-6000	
(PEG-6000)	Serva, Heidelberg
Rinderserumalbumin krist.,	Serva, Heidelberg
reinst	
Servalyte (Carrier Ampholyte)	Serva, Heidelberg
Streptomycinsulfat	Heyl, Berlin
Sucrose, reinst (M = 342,3)	Serva, Heidelberg
TEMED - N,N,N',N'-	Serva, Heidelberg
Tetramethyläthylendiamin	
$\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$ (M = 116,2)	
Triton X-100 - Octylphenol-	Serva, Heidelberg
polyethylenglykolether	

1.1.5 Labormaterial und Geräte

Fraktionssammler	LKB, Multirac 2111, Fa. LKB, Gräfelfing bei München
UV-Detektor	LKB Uvicord S 2138, Fa. LKB, Gräfelfing bei München
Pumpen	LKB Varioperpex Pump 2120, Fa. LKB Gräfelfing bei München Gilson Minipuls 2, Fa. Gilson, Düsseldorf
Flachbettschreiber	LKB Recorder 2210, Fa. LKB, Gräfelfing bei München
Zentrifugen	Stock, max. 2200 g, Fa. Stock, Marburg Kontron Ultrazentrifuge, TGA-65, Fa. Kontron, Eching bei München
Beta-Zähler	Multi User LSC LB 5004, Fa. Berthold
Mikroskop	Olympus Tokio CK
Rotoren	SW-41, Fa. Beckmann, München TST-41, Fa. Kontron, Eching bei München
Photometer	Fa. Eppendorf, Hamburg Multiskan MC, Fa. Flow, Meckenheim
Ultraturrax	Fa. Janke & Kunkel, Freiburg i. Breisgau
Micro-Shaker	Fa. Dynatech, Plochingen
PPN-Röhrchen, 4,5 ml	Fa. Greiner Labortechnik, Nürtingen
Petri-Schälchen, 6 cm	Fa. Greiner Labortechnik, Nürtingen
Mikrotiterplatten	Costar, Fa. Tecnomara, Gießen
Pipetten, Multipette, Combitips und Steriltips	Fa. Eppendorf, Hamburg

Titertek Mehrkanal- pipette	Fa. Flow, Meckenheim
Spannungsgeber	LKB Power Supply 2103, Fa. LKB, Gräfelfing bei München
Kühlgerät	Multitemp II, Fa. LKB, Gräfelfing bei München
Elektrophoresegeräte	LKB Ultrophor Electro- focusing Unit 2217, Fa. LKB, Gräfelfing bei München
Film	X-Ray Film, Kodak indirect exposure film, Fa. Kodak, München

1.1.6 Monoklonale Antikörper gegen den Stamm O₁Kaufbeuren

Maus-Aszitesflüssigkeit mit monoklonalen Antikörpern gegen ein Isolat des Stammes O₁Kaufbeuren wurde mir freundlicherweise von Herrn Dr. Thiel zur Verfügung gestellt, ebenso eine Anti-Maus IgG-Präparation von der Ziege.

1.2 Methoden

1.2.1 Zellen

Als Zellsystem wurden BHK-21-Zellen (Stoker und Mac Pherson, 1964) der Linie CT verwendet (Ahl, 1974). Sie wurden in Rollrohren (7 x 35 cm) mit Medium, bestehend aus Glasgow Modifikation von Eagles Medium, Eagle mit Zusätzen, Tryptose-Phosphat-Bouillon und 10% Kälberserum, gezüchtet. Ein dichter Zellrasen hatte sich nach 3 Tagen Inkubation bei 37°C ausgebildet. Ein Rohr enthielt ca. $3,5 \times 10^8$ Zellen.

1.2.2 Virusproduktion

Zur Virusvermehrung wurden vier Tage alte Kulturen von BHK-21-CT-Zellen verwendet. Die Kulturen wurden mit 50 ml PBS gewaschen und nach Zugabe von 50 ml PM-13 plus 1% Pferdeserum mit $10^{8,5}$ plaquebildenden Einheiten (PBE) Gewebekulturvirus infiziert. Nach einer Inkubationszeit von 18 Stunden bei 37°C wurden die Zellreste durch Zentrifugation des Mediums (30 Minuten bei 3000 Upm) sedimentiert. Der Überstand wurde in Portionen abgefüllt und bei -70°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Der Titer des so gewonnenen Gewebekulturvirus wurde im Plaquetest oder in Mikrotiterplatten ermittelt. In der Regel enthielten die Virussuspensionen ca. $10^{8,5}$ plaquebildende Einheiten (PBE) pro Milliliter.

1.2.3 Virusreinigung und Lagerung von gereinigtem Virus

Die Virusreinigung wurde mit einigen Modifikationen nach der von Doel und Baccarini (1981) beschriebenen Methode durchgeführt.

Das Anzuchtmedium der Zellkulturen in Rollrohren wurde abgesaugt, der Zellrasen mit 50 ml PBS gewaschen und wie beschrieben mit MKS-Virus infiziert. Nach 18 Stunden Inkubation bei 37°C erfolgte eine Zentrifugation des Mediums von 30 Minuten bei 3000 Upm. Der Überstand wurde abgenommen und nach Zugabe von 16,5 ml PEG-Lösung (in Tris) pro 100 ml Medium (etwa 7% Endkonzentration) 2 Stunden bei 4°C auf dem Magnetrührer gerührt. Diese Mischung wurde 30 Minuten bei 3000 Upm zentrifugiert. Die Elution des Sediments erfolgte in 1/20 des Ausgangsvolumens in NaClP-Puffer über 30 Minuten. Das Eluat wurde in Spitzröhrchen 15 Minuten bei 3000 Upm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und aufgehoben. Nach Resuspension des Sediments in 1/20 des Ausgangsvolumens Puffer folgte eine Zentrifugation über 15 Minuten bei 3000 Upm. Dieser Überstand wurde mit dem Überstand der ersten Zentrifugation vermischt. Dem Konzentrat wurde 1/5 des Volumens Arcton zugefügt, mit Hilfe des Ultraturrax vermischt und das Gemisch 15 Minuten bei

3000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde 2 Stunden bei 30 000 Upm zentrifugiert (Rotor SW-41, Temperatur 10°C). Nach der Sedimentation wurde der Überstand verworfen und das Sediment in 1,0 ml NaClP-Puffer mit 1% Triton X-100 über Nacht gelöst. Danach wurden ca. 1,0 ml des gelösten Sediments auf 15-32%ige Saccharosegradienten gesetzt und mit einem SW-41 Rotor bei 5°C und 27000 Upm 2 Stunden zentrifugiert. Fraktionen von 0,6 ml Volumen wurden nach Bestimmung der optischen Dichte bei 254 nm gesammelt. Sofern das gereinigte Antigen nicht sofort weiterverarbeitet, sondern bei -70°C gelagert werden sollte, wurde der NaClP-Puffer im Zuckergradienten ersetzt durch ein Gemisch aus Earlscher Lösung, 0,016 M HEPES und 0,1% Rinderserumalbumin. Die Überprüfung der Stabilität von in diesem Puffer gelagerten Virus ist in Abbildung 1 dargestellt. Die Ergebnisse dieser Vorversuche zeigen, daß durch den Zusatz von HEPES und Rinderserumalbumin zu Earle'scher Salzlösung eine hohe Stabilität des gelagerten MKS-Virus erzielt wurde. Die Ausmessung der Peaks aus einer erneuten Gradientenzentrifugation ergab eine nahezu vollständige Rückgewinnung der eingesetzten Virusmenge. Der Verlust an 146 s-Partikeln des MKS-Virus nach 6 Wochen Lagerung bei +4°C oder -70°C betrug ca. 5-10% der gereinigten Virusmenge (s. Abb. 1 und 2).

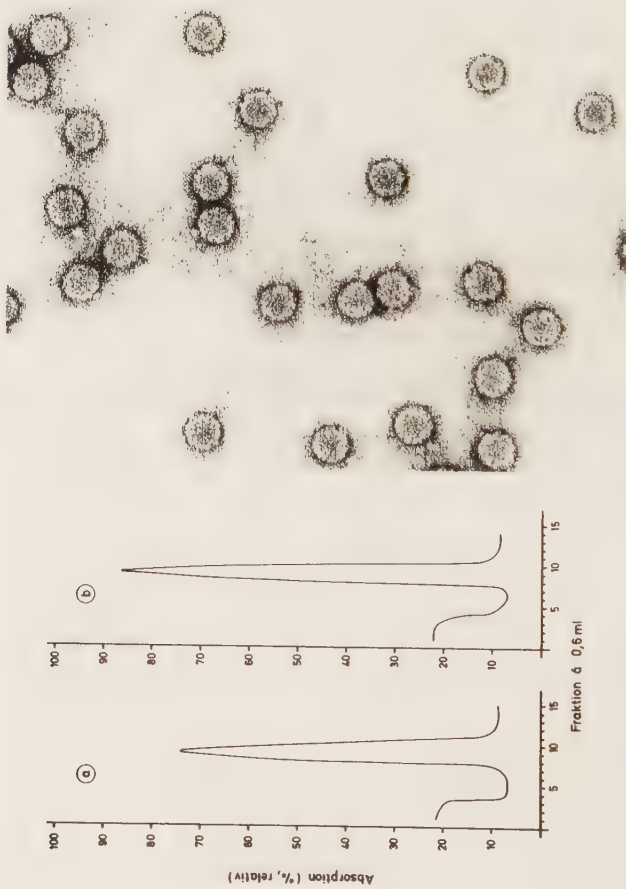


Abb. 1 - Absorptionsprofile von gereinigtem MKS-Virus bei 254 nm aus
Sucrosegradienten (15-32%), nach Lagerung bei 4°C (a) bzw. bei
Abb. 2 - Elektronenmikroskopische Darstellung von gereinigtem MKS-Virus,
Endvergrößerung: 245.000fach, Uranylacetat-Färbung.

1.2.4 Reinigung von radioaktiv markiertem MKS-Virus

Die in Rollrohren angezüchteten 4-tägigen BHK-21-CT-Zellen wurden nach Abnahme des Anzuchtmediums zweimal in PBS gewaschen und mit $10^{8,5}$ PBE Gewebekulturvirus infiziert. Nach einer Adsorptionszeit von 1 Stunde bei 37°C folgte die Zugabe von 10 ml Medium, bestehend aus PBS-Glukose und 25 $\mu\text{Ci/ml}$ ^{35}S -Methionin (spezifische Aktivität 800 Ci/mmol). Die Kulturen wurden 12 Stunden bei 37°C gehalten und dann bei -70°C für 20 Minuten eingefroren. Das Medium mit den lysierten Zellen wurde 30 Minuten bei 3000 Upm zentrifugiert und dem Überstand (ca. 10 ml) 2,0 ml PEG-6000-Lösung (in Tris) zugegeben, so daß in der Endverdünnung eine Konzentration von etwa 7% PEG resultierte. Dieses Gemisch wurde 2 Stunden bei 4°C gehalten und regelmäßig aufgerührt. Darauf folgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 3000 Upm. Das Sediment wurde in 5 ml NaClP-Puffer aufgenommen und 15 Minuten bei Zimmertemperatur eluiert. Das Eluat wurde 15 Minuten bei 3000 Upm zentrifugiert, der Überstand gewonnen und das Sediment in weiteren 5 ml desselben Puffers resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 3000 Upm wurde der Überstand gewonnen und mit dem der vorhergehenden Zentrifugation vermischt.

Diesem Volumen wurde 4 ml Arcton zugegeben und das Gemisch 30 Minuten geschüttelt. Nach einer weiterer Zentrifugation und Gewinnung der oberen wässrigen Phase erfolgte eine Zentrifugation über 2 Stunden im Rotor SW-41 bei 10°C und 30.000 Upm.

1.2.5 Gewinnung von Hyperimmunseren und Rekonvaleszentenseren

Durch Gradientenzentrifugation gereinigtes Virus wurde in NaClP-Puffer 1:5 verdünnt und Gruppen von vier Meerschweinchen verabreicht. Je 0,05 ml des Antigens wurde in die Zunge und je 0,1 ml intradermal in die Planten injiziert (Knudsen et al., 1982; Hyde & Graves, 1963). Nach 30 Tagen erfolgte eine Reimmunisierung der Meerschweinchen. Dazu wurde das gereinigte Antigen 1:4 in NaClP-Puffer verdünnt und mit gleichem Volumen Freundsches komplettes Adjuvans gemischt. Diese Emulsion wurde den

Meerschweinchen intramuskulär in beide Hintergliedmaßen in Dosen von je 0,5 ml verabreicht. Die Blutentnahme erfolgte nach weiteren 14 Tagen. Hierzu wurden die Meerschweinchen in Äthernarkose durch Herzpunktion entblutet. Nach 12 Stunden bei 4°C wurde das Blut 15 Minuten bei 3000 Upm in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert, das Serum gewonnen, bei 56°C 30 Minuten inaktiviert und bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

Zur Herstellung von Rekonvaleszentenserum wurden Rinder mit Gewebekulturvirus oder Aphthenmaterial in das Zungenepithel infiziert und nach 7, 14 und 21 Tagen durch Punktion der V. jugularis geblutet. Die Serumgewinnung, Inaktivierung und Lagerung erfolgte in der oben beschriebenen Weise.

1.2.6 Prüfung der Hyperimmun- und Rekonvaleszentenserum auf Antikomplementarität

Von jedem inaktiviertem Meerschweinchen-Hyperimmunserum und Rinder-Rekonvaleszentenserum wurde eine Verdünnung von 1:2,5 in KBR-Puffer hergestellt. Die Komplementverdünnung wurde in diesem Test 1½ stärker gewählt als die Dosis, die gerade eine komplette Lysis ergibt. Zur Prüfung der Seren wurden 0,25 ml des verdünnten Serums, 0,25 ml physiologische Kochsalzlösung (als Antigensatz), 0,25 ml Komplementverdünnung und 0,50 ml hämolytisches System beigemischt. Als Kontrolle diente ein Röhrchen, das anstelle des Serums physiologische Kochsalzlösung enthielt. Die Gemische wurden 30 Minuten im Wasserbad bei 37°C gehalten und dann bei 3000 Upm zentrifugiert und abgelesen. Bei den Seren, die keine Antikomplementarität aufwiesen, trat eine vollständige Lysis ein, während antikomplementär wirkende Seren eine mehr oder minder große Menge nicht gelöster Erythrozyten enthielten. Diese Seren wurden verworfen.

1.2.7 Gewinnung von Komplement

Zur Herstellung des in der KBR verwendeten Komplements wurde einer

Gruppe von 10 Meerschweinchen in Äthernarkose durch Herzpunktion jeweils 10 ml Blut entnommen und das Serum gewonnen. Die Seren wurden gemischt, 1:2 in Witte'scher Lösung verdünnt und in Portionen zu 2 ml bis zum Gebrauch bei -70°C gelagert.

1.2.8 Virustitration im Suspensionsplaquetest

Der Suspensionsplaquetest nach Cooper (1961) wurde für das BHK-CT-System nach der von Ahl (1974) beschriebenen Modifikation durchgeführt.

In Plastik-Petrischälchen mit 6 cm Durchmesser wurden 4 ml Agarosemedium, hergestellt aus 1,2%iger Agaroselösung und der gleichen Menge zweifach konzentrierter Earle'scher Salzlösung mit Zusätzen, einpipettiert (Baselayers).

BHK-CT-Zellen wurden mit PBS-T abgelöst und nach Zusatz von 25% Pferdeserum 8 Minuten bei 800 Upm zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in Medium, bestehend aus PM-13 und 2% Pferdeserum, aufgenommen und die Suspension in Röhrchen in Mengen von 0,9 ml abgefüllt. Die Zelldichte wurde zuvor auf 2×10^7 Zellen/ml eingestellt.

Das Zellkulturvirus wurde zur annähernden Titerbestimmung in $\log_{10}$ -Abstufungen, zur exakteren Titerbestimmung jedoch in $\log_2$ -Abstufungen in PBS mit Zusatz von 2% Pferdeserum verdünnt. Diese Verdünnungen wurden in Mengen von jeweils 0,1 ml auf die Zellsuspensionen verimpft. Nach Zugabe von 1 ml Agarosemedium wurden die Virus-Zell-Gemische auf die Baselayers ausgegossen. Die Inkubation der Schälchen erfolgte über 40 Stunden bei 37°C in 3%iger CO₂-Atmosphäre. Anschließend wurden die Plaques ausgezählt und die Virustiter, ausgedrückt als PBE/0,1 ml, berechnet.

1.2.9 Serologische Tests

1.2.9.1 Plaquereduktionstest

Der Plaquereduktionstest wurde entsprechend der unter 1.2.8 beschriebenen Methode durchgeführt. Hierzu wurden die zu untersuchenden Seren in $\log_2$ -Abstufungen in PBS mit 2% Pferdeserum verdünnt. Die Virusverdünnung wurde so gewählt, daß etwa 400 PBE in 0,1 ml enthalten waren.

Von jeder Serumverdünnung wurde 0,5 ml mit 0,5 ml Virusverdünnung gemischt und 2 Stunden im Wasserbad bei 37°C inkubiert.

Je 0,1 ml der Serum-Virusgemische wurde auf Röhrchen mit Zellsuspension verimpft und nach Zugabe von Agarosemedium auf vorbereitete Petrischälchen ausgegossen. Es folgte die Inkubation der Schälchen für 40 Stunden bei 37°C in 3%iger CO_2 -Atmosphäre.

In jedem Testansatz wurden die verwendeten Virusstämme in $\log_2$ -Abstufungen austitriert, um anhand des Titers möglichst genau die Virusmenge zu bestimmen, die in den Virus-Serumgemischen enthalten war. Diese Virusmenge wird als V_0 bezeichnet.

Nachdem die mittlere Anzahl Plaques pro Verdünnung ermittelt war, wurde für jede Verdünnungsstufe des geprüften Immunserums die Reduktion der eingesetzten Anzahl PBE berechnet. Drei oder vier $\log_{10}$ -Werte aus den abgestuften Serumverdünnungen wurden für die Berechnung des Wertes verwendet, bei dem die Plaquezahl um 90% (= 1 $\log_{10}$; SN_{90} -Wert) reduziert war. Der Serumtiter ist in der Regel als $\log \text{SN}_{90}$ angegeben (s. Abb. 3). In jedem Plaquereduktionstest wurde ein Standardserum mitgeführt. Als Standardserum diente das Immunserum eines mehrfach trivalent vakzinieren Rindes (Nr. 522).

Das Standardserum wurde mit dem Virustypen O_1 , A_5 und C_1 getestet. Für den Typ O_1 ergab sich aus 42 Tests ein Mittelwert von 3,23 $\log_{10}$ für SN_{90} . Das entspricht einem Serumtiter von 1:1700. Die Standardabweichung betrug $s = 0,057 \log$, und die Standardabweichung des Mittelwertes ist danach $S_m = S / n = 0,009 \log$. Für $p = 0,95$ liegt

dann der Konfidenzbereich für $\log SN_{90}$ zwischen 3,21 und 3,25. Für den Subtyp A_5 Westerwald betrug die Standardabweichung 0,062 log und für den Typ C_1 Oberbayern 0,075 log. Daraus ergibt sich, daß eine Differenz von $> 0,2 \log_{10}$ zwischen zwei $\log SN_{90}$ -Werten mit 5% Irrtumswahrscheinlichkeit einen signifikanten Unterschied anzeigt (s. Abb. 4).

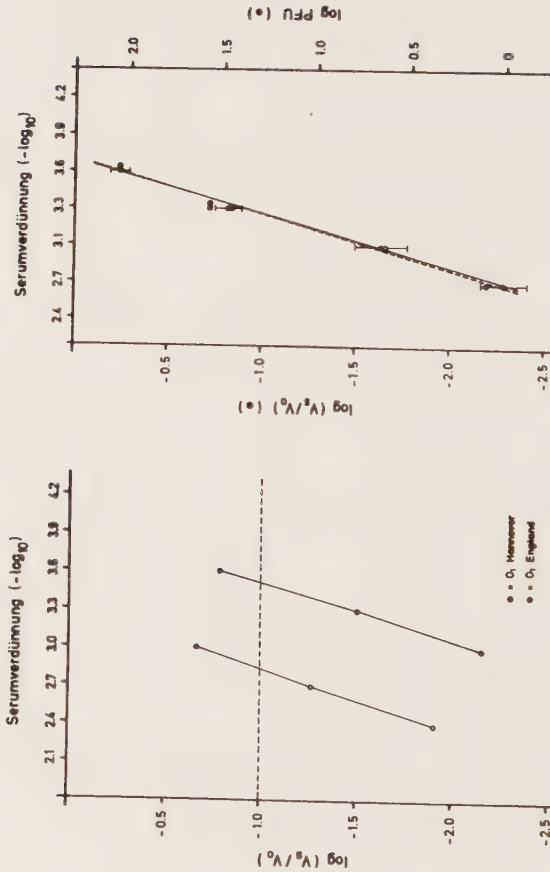


Abb. 3 - Plaquereduktion (in log₁₀) von MKS-Virus O₁ Hannover (•) und O₁ England (o) nach der Reaktion mit Meerschweinchen-Hyperimmunserum O₁ Hannover.

Abb. 4 - Neutralisierung des MKS-Virusstammes O₁ Kaufbeuren nach der Reaktion mit dem Standardserum (Rd 522), dargestellt als Plaquereduktion (log V/V₀, •) und als restliche Anzahl Plaques (log PFU) (o). Die Bereiche geben die Standardabweichung der Mittelwerte wieder.

1.2.9.2 Mikro-Neutralisationstest (NT)

Die Methode des Mikro-NT wurde zur vorläufigen Bestimmung der homologen Serumtiter der Meerschweinchen-Hyperimmunseren bzw. Rekonvaleszentenseren von Rindern angewandt. Die Seren wurden in Medium, bestehend aus MEM, 10% TPB und 5% Pferdeserum, verdünnt. In jedem Testansatz wurde der homologe Virusstamm verwendet. Ausgehend von einer Vorverdünnung wurden die Seren in $\log_2$ -Abstufungen in Mikroplatten verdünnt. Das Virus wurde so verdünnt, daß in der Gebrauchsverdünnung noch ca. 100 ID₅₀ in 0,1 ml enthalten waren. Gemische von 50 µl Serumverdünnung und 50 µl Virusverdünnung wurden 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Darauf folgte die Zugabe von 100 µl Zellsuspension (BHK-21-CT). Die Platten wurden weitere 48 Stunden bei 37°C mit 3% CO₂ inkubiert und danach mit Kristallviolett gefärbt und abgelesen. Die Auswertung erfolgte nach der Methode von Kärber (1931).

1.2.9.3 Komplementbindungsreaktion

Die Komplementbindungsreaktion (KBR) wurde in Mikrotiterplatten (Mikro-KBR) in einer Modifikation der Methode nach Forman (1974a, b) durchgeführt. Zur Herstellung des hämolytischen Systems wurden gewaschene Hammelerythrozyten 1:60 in KBR-Puffer verdünnt. 1,0 ml dieser Verdünnung wurden mit 9,0 ml H₂O gemischt. Bei vollständiger Lysis sollte die optische Dichte bei 541 nm 0,35 betragen. Lag die optische Dichte über diesem Wert, wurde nach folgender Formel korrigiert:
$$V' = (V-1) \cdot \frac{x}{0,35}$$
 wobei V die Menge der 1:60

verdünnten Erythrozytensuspension und x die gemessene optische Dichte darstellt. Um die im Test anzuwendende Ambozeptorverdünnung zu ermitteln, wurde eine Ambozeptorverdünnung gewählt, die etwas über der lag, die gerade eine vollständige Lysis ergab.

Um eine Komplementverdünnung zu bestimmen, die 1,5 50%-Lysiseinheiten (C'H₅₀) enthält, ist eine Komplementauswertung erforderlich. Hierzu wurden 7 Röhrchen mit je 0,5 ml KBR-Puffer

gefüllt und jeweils mit steigenden Mengen Puffer (von 0 bis 0,6 ml) und abfallenden Mengen Komplement (von 1,0 bis 0,4 ml), 1:150 verdünnt, gemischt. Das System wurde 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert und nach Zugabe von 1,0 ml des hämolytischen Systems weitere 45 Minuten bei 37°C gehalten. Die optische Dichte von jedem Röhrchen wurde bei 541 nm gemessen. Bezogen auf den 100%-Hämolysen-Wert wurde der relative Grad der Lysis, ausgedrückt als $\frac{Y}{1 - Y}$, der gesamten Verdünnungsreihe bestimmt.

Im log-log-Papier wurde graphisch die Menge Komplement ermittelt, die 50% Hämolysen bewirkt. Anhand dieses Wertes erfolgte die Berechnung der Komplementverdünnung, die in 0,5 ml 50% Hämolysen ergab (= $1 \cdot C'_{H_{50}} / 0,5$ ml). Die eineinhalbfache Konzentration (= $1,5 \cdot C'_{H_{50}}$ pro 0,5 ml) wurde im Test eingesetzt.

Bei der Durchführung der Mikro-KBR wurden Serum und Antigen in $\log_2$ -Abstufungen in Mengen von je 25 μ l mit 25 μ l Komplementverdünnung angesetzt und 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Hierzu wurden die Mikroplatten mit Klebefolie versiegelt. Im Test wurden 2 Antigenkontrollen angesetzt: KBR-Puffer als Serumersatz mit Antigen und Komplement sowie KBR-Puffer als Komplement- und Serumersatz mit Antigen. Eine Serumkontrolle enthielt KBR-Puffer als Antigensersatz, Antiserum und Komplement, die zweite Serumkontrolle KBR-Puffer als Komplement- und Antigensersatz und Antiserum. Die Komplementkontrolle enthielt 25 μ l Komplementverdünnung und 50 μ l KBR-Puffer und die Kontrolle für vollständige Lysis 75 μ l H_2O . Die Kontrollen wurden ebenfalls 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Zugabe von 50 μ l hämolytischem System. Die Platten wurden nach dem Versiegeln weitere 45 Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation der Platten bei 1500 Upm (s. Abb. 5), und 75 μ l des Überstandes wurden auf Mikrotiterplatten mit U-förmigen Boden übertragen. Die Messung der optischen Dichte erfolgte mit Hilfe eines Multiskan-MC-Photometers bei einer Wellenlänge von 414 nm. Anhand der gemessenen optischen Dichte wurde eine Tabelle erstellt, die neben den gemessenen Werten

optische Dichte in Prozent, bezogen auf die 100% Lysis-Kontrolle, enthält.

Die Serumverdünnung, bei der die Hämolyse 50% beträgt, wurde graphisch ermittelt.

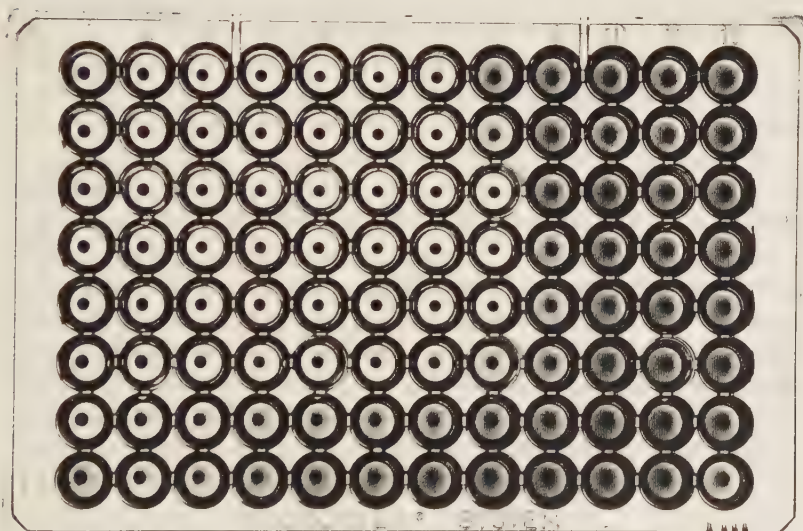


Abb. 5 - Komplementbindungsreaktion (KBR) in Mikrotiterplatten (nach Forman, 1974a, b). Die Abbildung zeigt eine Mikrotiterplatte nach der Zentrifugation der nicht lysierten Erythrozyten vor der Übertragung des Überstands auf eine zweite Mikroplatte. Serumverdünnung in $\log_2$ -Abstufungen von links nach rechts, Antigenverdünnung in $\log_2$ -Abstufungen von oben nach unten.

1.2.10 Isoelektrofokussierung

Zur Isoelektrofokussierung der virusspezifischen Proteine des MKS-Virus wurde die von King und Newmann (1980) ausgearbeitete Methode angewandt. Diese Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Matheka durchgeführt.

Für die Gewinnung von zytoplasmatischen Extrakten wurden eintägige Monolayer-Kulturen in 4 x 6-Lochplatten mit verschiedenen Virusstämmen bei einem Virus/Zell-Verhältnis von 50:1 infiziert und zur Adsorption 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Zugabe von ³⁵S-Methionin erfolgte 90 Minuten nach der Infektion. Nach weiterer Inkubation von 30 Minuten wurden die Zellen gewaschen und mit komplettem Medium erneut für 30 Minuten inkubiert (Puls-Chase-Experiment). Nach mehrfachem Waschen wurden die Zellen mit Lysispuffer aufgeschlossen. Die Abtrennung der virusspezifischen Proteine von zellulären Bestandteilen in den Extrakten erfolgte durch Zugabe von spezifischem Meerschweinchen-Hyperimmunserum und anschließende Präzipitation der Antigen-Antikörper-Komplexe durch Staph. aureus-Zellen (Pansorbin). Nach Inkubation für 15 Minuten bei 37°C wurde die Suspension durch Zentrifugation sedimentiert. Das gewaschene Sediment wurde in 50 µl Lysis-Puffer aufgenommen. Nach Zugabe von 2-Mercaptoäthanol, NP-40, Harnstoff und Bromphenolblau sowie erneuter, kurzer Zentrifugation wurde die Präparation für die Elektrofokussierung verwendet. Die Elektrofokussierung erfolgt in fünfprozentigen Polyacrylamidgelen, die 8 M Harnstoff und Servalyte-Trägerampholine für den geeigneten pH-Bereich enthielten.

Anodische und kathodische Läufe erfolgten in einem pH-Bereich zwischen 3,0 und 10,0. Dreißig Minuten nach Polymerisierung der Gele wurden die Proben in Mengen von 5-10 µl pro Bahn aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 3000 Volt und 20 Watt. Nach 2-stündiger Laufzeit wurden die Gele mit Coomassie Brilliant Blau R-250 gefärbt, anschließend entfärbt und getrocknet. Zur Sichtbarmachung der radioaktiv markierten Proteinbanden im Gel wurde die Autoradiographie auf X-Ray Film je nach Markierungsintensität für 6 Stunden bis 3 Tage bei 20°C durchgeführt.

2. ERGEBNISSE

2.1. Charakterisierung von Virusstämmen und Virusklonen anhand der Plaquemorphologie

Die für die serologische Charakterisierung von Virusstämmen und Klonen des Subtyps O₁ angewandte Methode des Plaquereduktionstests ermöglichte zugleich die Charakterisierung der Virusisolate nach ihrer Plaquebildung. Die Bewertung der Plaquemorphologie bezog sich dabei auf:

1. die relative Plaquegröße
2. den Plaquerand (stumpfe und scharfe Plaqueränder)
3. den Grad der Zellysis (klare und trübe Plaques).

Danach wurden die von einzelnen Virusstämmen gebildeten Plaques als große Plaques (LP) mit meist guter Zellysis und stumpfen Rand, kleine Plaques (SP) mit einem durchschnittlich um 5 mm geringerem Durchmesser und in der Regel zugleich erhöhten Grad an Zellysis und scharf abgegrenztem Rand klassifiziert (s. Abb. 6). Jeweils eine Ausnahme von dieser Regel bildeten der Stamm O Finistère, welcher große Plaques mit scharfem Rand und starker Zellysis bildet, O₁Fyn 83, der nur mittelgroße Plaques mit stumpfen Rand bildet, und O Wuppertal, der sehr große, nicht deutlich von der Umgebung abgegrenzte Plaques mit geringer Zellysis formt. Die größte, mit der Abkürzung LP gekennzeichnete Gruppe bilden: O₁Lombardel, O₁Hannover, O Spanien, O₁Brent, O₁Basel, O₁Kaufbeuren, O₁Burgsteinfurt, O₁Murchin, O₁Dänemark und O Austria.

Die Bezeichnung SP war auf die Stämme O₁England, O₁BFS 1860, O₁Lyon und O Israel anzuwenden.

Diese Plaquemarker erwiesen sich in der Regel als weitgehend stabile, durch Passagen in BHK-CT-Zellen nicht veränderte Merkmale. Das Merkmal LP stimmte außerdem, soweit es überprüfbar war, mit dem direkt vom Rind isolierten Virus (erste Plaquepassage) gut überein. Es ist aber bekannt, daß verschiedene Zelllinien, darunter auch Abkömmlinge der Linie BHK-21, MKS-Viruspopulationen in der Weise

selektieren, daß sich nach einigen Passagen ein deutlich verändertes Plaquebild ergibt. Dieses trifft vermutlich auf einige SP-Virusstämme aus Zellkulturpassagen zu. Die Vermutung begründet sich auch auf die Beobachtung, daß in den Plaquetests wiederholt Plaques mit abweichenden Merkmalen auftraten. Virus aus solchen Plaques erwies sich nach der Klonierung als relativ stabil. So handelt es sich auch bei dem von uns als O₁Lyon bezeichnete Stamm, welcher von O₁Lausanne (1965) (Nabholz, 1966) abstammt, wahrscheinlich um eine in Zellkulturen selektierte Mutante. Wie weit solche Selektion auch auf O₁England, O₁BFS 1860 und O Israel zutrifft, war nicht genau zu überprüfen. Der Stamm O₁BFS 1860 wurde aber als plaquegereinigtes Virus erhalten und stand nicht als Rindenvirus zur Verfügung. Ebenso hatten die Virusstämme O₁England und O Israel schon mehrere Zellkulturpassagen durchlaufen. Sie wurden für unsere Versuche nicht kloniert. Von dem Stamm O₁Lyon ließen sich sowohl aus Plaquetests als auch aus einer Passage im Rind (Rd. 142) verschiedene Klone isolieren. Auch diese wurden nach der Plaquegröße klassifiziert und wie folgt charakterisiert:

O₁Lausanne-Lyon, Cl 165 (LP),
O₁Lausanne-Lyon, Cl 240 (LP),
O₁Lausanne-Lyon, Cl 248 (SP),
O₁Lausanne-Lyon, Cl 249 (LP).

Auch die Gruppe der als O₁Lausanne bezeichneten Klone 197, 199 und Rd 696, Cl 191 wiesen eine Heterogenität auf, die sich nach den Plaquemerkmale LP für Klon 199 und als SP für Klon 197 und Rd 696, Cl 191 unterteilen ließen. Der vom Wellcome FMD Laboratory in Pirbright erhaltene Stamm O₁Lausanne '65 wies in der ersten Plaquepassage nur kleine Plaques auf, die jedoch nicht stabil waren. In weiteren Passagen wurden nur noch LP gefunden, die zwei mal geklont wurden, und als O₁Lausanne '65 LP und O₁Lausanne '65, Cl 226 (LP) bezeichnet wurden.

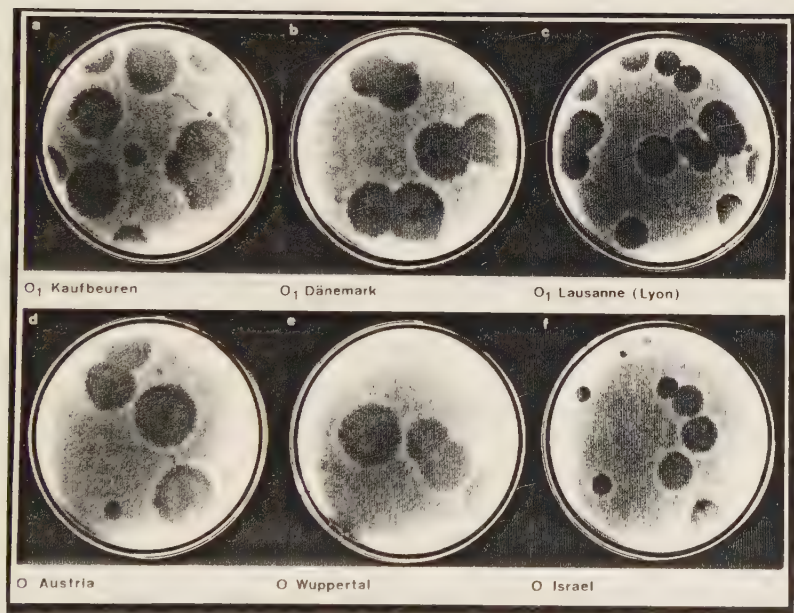


Abb. 6 - Plaquebildung im Suspensionsplaquetest verschiedener MKS-Virusstämme.

2.2 Identifizierung von Virusisolaten des Typs O anhand des
Plaquereduktionstests

2.2.1 Verwandtschaftsgrad zwischen Stämmen verschiedener
Subtypen: O₁ Kaufbeuren und O₂ Brescia

Um den Unterschied zwischen zwei verschiedenen Subtypen, in diesem Fall O-Subtypen, zu verdeutlichen, wurden die Stämme O₁Kaufbeuren (1966) und O₂Brescia (1947), der Referenzstamm für den Subtyp O₂, verglichen. Die in Tabelle 7 enthaltenen Serumtitern (Meerschweinchen-Hyperimmunseren) wurden in Plaquereduktionstests ermittelt. Wie schon erwähnt, dienen zur Bestimmung des Verwandtschaftsgrades zwischen zwei verschiedenen Virusstämmen:

1. die Differenz der Logarithmen von heterologen und homologen Serumtitern,
2. das Verhältnis von heterologen zu homologen Serumtitern, (r-Werte),
3. das Kreuzreaktionsprodukt, ausgedrückt in Prozent als $R = \sqrt{r_1 \times r_2} \times 100$.

Nach unseren Berechnungen liegt der Signifikanzbereich in Bezug auf die Titer-Differenzen bei $\pm 0,2 \log_{10}$.

Brooksby (1968) schlug wie erwähnt vor, Virusstämme, deren r-Wert zwischen 0,5 und 1,0 liegt, als Stämme des gleichen Subtyps zu klassifizieren. r-Werte von 0,1 bis 0,5 sollten verschiedenen Subtypen zugeordnet werden, und r-Werte von 0,01 bis 0,1 sehr verschiedene Subtypen kennzeichnen, während verschiedene Virustypen durch r-Werte unter 0,01 gekennzeichnet sind.

Tab. 7 - Vergleich der MKSV-Subtypen O₁Kaufbeuren und O₂Brescia

Virus	O ₁ Kaufbeuren log SN ₉₀	O ₂ Brescia log SN ₉₀	O ₁ Kaufbeuren Titer-Differenz (log ₁₀)	O ₂ Brescia Titer-Differenz (log ₁₀)
Serum				
O ₁ Kaufbeuren	4,10	3,31	0	0,79
O ₂ Brescia	2,66	3,58	0,92	0
Virus	O ₁ Kaufbeuren r-Werte	O ₂ Brescia r-Werte	O ₁ Kaufbeuren R-Werte	O ₂ Brescia R-Werte
Serum				
O ₁ Kaufbeuren	1	0,16	100	14
O ₂ Brescia	0,12	1		100

Für den Vergleich der Virusstämme O₁Kaufbeuren und O₂Brescia ergeben sich aus unseren Versuchen Titer-Differenzen von 0,79 und 0,92 log₁₀, die r-Werten von 0,16 und 0,12 entsprechen. Der R-Wert mit 14% paßt in die Klassifizierung nach Brooksby (1968), wonach die beiden Stämme verschiedenen Subtypen zuzuordnen sind.

2.2.2 Vergleich von Virusstämmen mit hohem Verwandtschaftsgrad

Als Beispiel für zwei Virusstämme mit hohem Verwandtschaftsgrad wurden O₁Brent aus dem Seuchenzug der 60er Jahre und der 1982 in der DDR isolierte Stamm O₁Murchin ausgewählt. Der serologische Vergleich wurde wiederum im Plaquereduktionstest durchgeführt.

Die homologen und heterologen Serumtiter, ausgedrückt als log SN₉₀,

die Titer-Differenzen, die r-Werte, sowie der Verwandtschaftsgrad in Prozent, sind für diese Virusstämme in Tabelle 8 enthalten. Alle Tests wurden mit Meerschweinchen-Hyperimmunseren durchgeführt.

Tab. 8 - Vergleich zwischen den MKSV-Stämmen O₁Brent und O₁Murchin

Virus	O ₁ Brent log SN ₉₀ -Werte	O ₁ Murchin log SN ₉₀ -Werte	O ₁ Brent Titer-Differenzen (-log ₁₀)	O ₁ Murchin Titer-Differenzen (-log ₁₀)
Serum				
O ₁ Brent	4,23	4,12	0	0,12
O ₁ Murchin	4,14	4,25	0,11	0
Virus	O ₁ Brent r-Werte	O ₁ Murchin r-Werte	O ₁ Brent R-Werte (in Prozent)	O ₁ Murchin R-Werte (in Prozent)
Serum				
O ₁ Brent	1	0,78	100	78
O ₁ Murchin	0,78	1		100

Die geringen Titer-Differenzen und somit hohen r-Werte zeigen eine sehr große Ähnlichkeit zwischen den beiden untersuchten Stämmen an. Dies wird auch in den anhand von Titer-Differenzen erstellten Virusprofilen deutlich (s. Abb. 9 und 12).

Nach der von Brooksby (1968) vorgeschlagenen Klassifizierung zeigt der Verwandtschaftsgrad von 78% zwischen O₁Brent und O₁Murchin ebenso wie die Symmetrie in den r-Werten von jeweils 0,78, daß beide Stämme

in dem Bereich liegen, der für Virusstämme eines Subtyps gilt.

2.2.3 Vergleich von Virusstämmen mit geringem Verwandtschaftsgrad

Um den Verwandtschaftsgrad zwischen zwei unterschiedlichen Virusstämmen, die dem Subtyp O_1 zugerechnet werden, anhand eines Beispiels zu erläutern, werden die MKSV-Stämme O_1 Brent (1965) und O_1 Fyn'83 (1983) verglichen.

In Tabelle 9 sind sowohl die homologen und heterologen Serumtiter, als auch die Titer-Differenzen, r-Werte und R-Werte enthalten.

Tab. 9 - Vergleich der MKSV-Stämme O_1 Brent und O_1 Fyn'83

Virus	O_1 Brent	O_1 Fyn'83	O_1 Brent	O_1 Fyn'83
	log SN_{90}		Titer-Differenz ($-\log_{10}$)	
Serum				
O_1 Brent	4,23	3,87	0	0,36
O_1 Fyn'83	3,76	4,32	0,56	0
Virus	O_1 Brent	O_1 Fyn'83	O_1 Brent	O_1 Fyn'83
	r-Werte		R-Wert (in Prozent)	
Serum				
O_1 Brent	1	0,44	100	35
O_1 Fyn'83	0,28	0		100

Die aus Tabelle 9 ersichtlichen relativ hohen Titer-Differenzen und entsprechend niedrigen r-Werte zeigen eine geringe Ähnlichkeit zwischen den untersuchten Stämmen an. Sowohl nach der von Brooksby (1968) beschriebenen Einteilung der Virusstämme anhand von R-Werten als auch nach der von ihm vorgeschlagenen Zuordnung nach r-Werten handelt es sich bei O₁Brent und O₁Fyn'83 um verschiedene Subtypen.

Das Virus O₁Fyn'83 wurde jedoch sowohl im Report des Danish Veterinary Service (1983) als auch vom FMD World Reference Laboratory in Pirbright dem Subtyp O₁ zugeordnet. Weiter wurde festgestellt, daß das neue Isolat nicht identisch mit dem 1982 isolierten O₁Dänemark ist.

Insofern erweist sich die Zuordnung von Isolaten anhand von Referenzstämmen und nach Grenzwerten, wie von Brooksby vorgeschlagen, als problematisch.

Da O₁Brent und einige mit diesem Stamm praktisch identische Virusstämme (O₁Lausanne) in West-Europa zur Vakzineherstellung verwendet werden, ist es bei dem geringen Verwandtschaftsgrad zu O₁Fyn'83 wahrscheinlich, daß mit O₁Brent-Vakzine geimpfte Rinder gegen O₁Fyn'83 oder ähnliche Stämme nicht immun sind.

2.1.2.4 Serologische Beziehung zwischen O₁Lombardei, O₁Hannover und O Finistère

Der im Jahre 1946 isolierte MKS-Subtyp O₁Lombardei gilt, wie zuvor beschrieben, als Referenzstamm für den Subtyp O₁. Um die fließenden Übergänge der einzelnen Isolate innerhalb desselben Subtyps und die Schwierigkeiten, die eine strikte Klassifizierung mit sich bringt, erneut zu verdeutlichen, wurden die Stämme O₁Hannover und O Finistère mit dem Referenzstamm verglichen. Wie aus Tabelle 10 ersichtlich, zeigt sowohl die geringe Titer-Differenz, und somit der hohe r-Wert, als auch der R-Wert von 92% einen hohen Verwandtschaftsgrad zwischen O₁Lombardei und O₁Hannover an.

Zieht man nur die einseitige Relation zwischen zwei Serumtitern in

Betracht, so trifft dies auch für O_1 Lombardei und O Finistère zu. In diesem Fall beträgt die Relation des Meerschweinchen-Hyperimmunserums O_1 Lombardei gegen Virus O Finistère (r_1) 1,15, was auf einen hohen Verwandtschaftsgrad schließen läßt. Betrachtet man jedoch die Relation zwischen dem Virusstamm O_1 Lombardei und dem Serum Finistère, so läßt der hier erhaltene r-Wert (r_2) von 0,09, denselben Schluß nicht zu. Dies drückt sich auch in dem R-Wert von 32% aus. Vergleicht man jedoch O_1 Hannover und O Finistère, ergeben sich daraus r- und R-Werte, die auf einen großen Verwandtschaftsgrad hinweisen.

Zusammenfassend kann man anhand dieser Ergebnisse feststellen, daß eine große Ähnlichkeit sowohl zwischen O_1 Lombardei und O_1 Hannover, als auch zwischen O_1 Hannover und O Finistère besteht. Zwischen O_1 Lombardei und O Finistère läßt der geringe Verwandtschaftsgrad von 32% den Schluß zu, daß es sich hier entsprechend den von Brooksby (1968) vorgeschlagenen Grenzwerten um verschiedene Subtypen handelt.

Tab. 10 - Vergleich der Isolate O Hannover (1960), O Finistère (1957)
und dem Stamm O₁Lombardei (1946)

Virus	O ₁ Lombardei	O ₁ Hannover	O Finistère	
Serum				
O ₁ Lombardei	3,47	3,58	3,53	log SN ₉₀
O ₁ Hannover	3,29	3,47	3,50	
O Finistère	3,15	4,11	4,21	

Virus	O ₁ Lombardei	O ₁ Hannover	O Finistère	
Serum				
O ₁ Lombardei	0	-0,11	-0,06	Titer Diff.
O ₁ Hannover	0,18	0	-0,03	in log ₁₀
O Finistère	1,06	0,10	0	

Virus	O ₁ Lombardei	O ₁ Hannover	O Finistère	
Serum				
O ₁ Lombardei	1	1,29	1,15	r-Werte
O ₁ Hannover	0,66	1	1,07	
O Finistère	0,09	0,79	1	

Virus	O ₁ Lombardei	O ₁ Hannover	O Finistère	
Serum				
O ₁ Lombardei	100	92	32	R-Werte
O ₁ Hannover		100	92	
O Finistère			100	

2.2.5 Homologe und heterologe Serumtitern und Bestimmungen von
Verwandtschaftsgraden anhand von Titer-Differenzen,
r-Werten und R-Werten

In den Tabellen 11 bis 14 werden die mittels Kreuzreaktionen mit spezifischen Meerschweinchen-Hyperimmunseren und Zellkulturvirus ermittelten homologen und heterologen Serumtitern und die daraus errechneten Titer-Differenzen, r-Werte und R-Werte der in 1.1.3 aufgezählten Virusstämme dargestellt. Jedes untersuchte Hyperimmunserum stammt aus einem Serumpool von vier Tieren. Die individuellen Seren waren von ähnlicher Qualität und wiesen nur gering abweichende Titer auf. Jede Titerbestimmung basierte auf mindestens zwei Tests.

Aus diesen Tabellen wird ersichtlich, daß eine Einteilung in bestimmte Gruppen nach dem Verwandtschaftsgrad innerhalb des Subtyps O₁ möglich ist. So bilden z.B. O₁Hannover und O₁Lombardei eine Gruppe, O₁Hannover und O Finistère eine zweite und die in den Jahren 1965 bis 1967 isolierten Stämme O₁Brent, O₁Basel, O₁Kaufbeuren, O₁Burgsteinfurt, O₁England, O₁BFS 1860 und O₁Lyon eine dritte Gruppe. O₁Murchin und O₁Dänemark lassen sich in die Gruppe 1965 bis 1967 einordnen. O Wuppertal und O Austria weisen untereinander einen hohen Verwandtschaftsgrad auf, während Isolate wie O Spanien, O₁Fyn'83 und O Israel in keine der festgestellten Gruppen einzuordnen sind.

Tab. 11 - Homologe und heterologe Titer von Meerschweinchen-Hyperimmunsereen, ausgedrückt als $\log SN_{90}$

Serum	Virus																
	1. O ₁ Lombardel 1946	2. O ₁ Finistère 1957	3. O ₁ Hannover 1960	4. O ₁ Spanien 1964	5. O ₁ Brent 1965	6. O ₁ Basel 1965	7. O ₁ Kaufbeuren 1966	8. O ₁ Burgsteinfurt 1966	9. O ₁ England 1967	10. O ₁ BFS 1860 1967	11. O ₁ Lyon (1966)	12. O ₁ Murchin 1982	13. O ₁ Dänemark 1982	14. O ₁ Fyn 1983	15. O ₁ Israel 1981	16. O ₁ Austria 1981	17. O ₁ Wuppertal 1982
1. O ₁ Lombardel	3,47	3,53	3,58	3,14	3,05	3,01	3,17	3,25	2,97	3,09	3,00	3,09	3,18	2,76	3,03	2,98	3,07
2. O ₁ Finistère	3,15	4,21	4,11	2,65	2,87	2,90	2,89	3,07	2,73	2,94	3,00	2,92	2,60	2,66	2,93	3,09	3,00
3. O ₁ Hannover	3,29	3,50	3,47	2,97	2,92	2,90	3,19	3,04	2,87	2,90	2,92	2,99	2,91	2,84	2,96	3,15	3,13
4. O ₁ Spanien	3,28	3,33	3,28	3,43	3,28	3,28	3,32	3,31	3,22	3,16	3,16	3,30	2,94	3,03	3,04	3,29	3,12
5. O ₁ Brent	3,64	3,33	3,45	3,46	4,23	4,33	4,05	4,43	3,60	3,67	3,62	4,12	4,18	3,87	3,39	3,52	3,31
6. O ₁ Basel	3,43	3,32	3,09	3,59	4,33	4,32	4,01	3,94	3,51	3,58	3,57	4,20	4,22	4,00	3,56	3,66	3,23
7. O ₁ Kaufbeuren	3,62	3,30	3,48	3,50	4,26	4,30	4,10	4,31	3,68	3,85	3,91	4,26	4,06	4,16	3,44	3,59	3,64
8. O ₁ Burgsteinfurt	2,88	2,68	2,89	2,81	3,95	3,63	3,65	3,97	3,16	3,27	3,18	3,69	3,64	3,36	2,84	2,78	2,82
9. O ₁ England	3,37	3,60	3,51	3,42	3,41	3,48	3,55	3,68	3,52	3,54	3,57	3,48	3,51	3,23	3,36	3,27	3,24
10. O ₁ BFS 1860	3,10	3,29	3,10	3,01	3,41	3,51	3,24	3,45	3,51	3,61	3,65	3,32	3,32	3,45	3,10	3,03	3,26
11. O ₁ Lyon	3,98	4,04	3,86	3,39	4,23	4,28	4,14	4,05	4,03	4,17	4,20	4,05	3,92	3,86	3,81	3,93	3,84
12. O ₁ Murchin	3,48	3,31	3,54	3,16	4,14	4,19	3,84	4,04	3,63	3,58	3,55	4,25	3,97	3,81	3,50	3,63	3,46
13. O ₁ Dänemark	3,38	3,38	3,42	3,12	4,13	4,10	3,96	4,08	3,61	3,58	3,73	4,19	4,03	3,86	3,50	3,59	3,41
14. O ₁ Fyn	3,57	3,36	3,56	3,40	3,76	3,95	3,47	3,82	3,88	3,59	3,75	3,74	3,56	4,32	3,61	3,62	3,32
15. O ₁ Israel	2,76	2,80	2,80	2,31	2,61	2,70	2,76	2,73	2,76	2,84	2,81	2,80	2,61	2,72	3,61	2,97	2,77
16. O ₁ Austria	3,16	3,52	3,41	3,07	3,42	3,53	3,45	3,59	3,23	3,41	3,37	3,53	3,42	3,43	3,43	3,94	3,77
17. O ₁ Wuppertal	3,65	3,51	3,54	3,30	3,59	3,68	3,61	3,66	3,62	3,56	3,59	3,58	3,48	3,37	3,65	3,99	3,95

Tab. 12 - Titer-Differenzen zwischen homologer und heterologer Reaktion (Meerschweinchen-Hyperimmunseren)

Serum	Virus																
	1. O ₁ Lamardel 1946	2. O ₁ Finistère 1957	3. O ₁ Hannover 1960	4. O ₁ Spanien 1964	5. O ₁ Brent 1965	6. O ₁ Basel 1965	7. O ₁ Kaufbeuren 1966	8. O ₁ Burgsteinfurt 1966	9. O ₁ England 1967	10. O ₁ BFS 1860 1967	11. O ₁ Lyon (1966)	12. O ₁ Murchin 1982	13. O ₁ Dänemark 1982	14. O ₁ Fyn 1983	15. O ₁ Israel 1981	16. O ₁ Österreich 1981	17. O ₁ Wuppertal 1982
1. O ₁ Lamardel	0	-0,06	-0,11	0,33	0,42	0,46	0,30	0,22	0,50	0,38	0,47	0,38	0,29	0,71	0,44	0,49	0,40
2. O ₁ Finistère	1,06	0	0,10	1,56	1,34	1,31	1,32	1,14	1,48	1,27	1,21	1,29	1,61	1,55	1,28	1,12	1,21
3. O ₁ Hannover	0,18	-0,03	0	0,50	0,55	0,57	0,28	0,43	0,60	0,57	0,55	0,48	0,56	0,63	0,51	0,32	0,34
4. O ₁ Spanien	0,15	0,10	0,15	0	0,15	0,15	0,11	0,12	0,21	0,27	0,27	0,13	0,49	0,40	0,39	0,14	0,31
5. O ₁ Brent	0,59	0,90	0,78	0,77	0	-0,10	0,18	-0,20	0,63	0,56	0,61	0,11	0,05	0,36	0,84	0,71	0,92
6. O ₁ Basel	0,89	1,00	1,23	0,73	-0,01	0	0,31	0,38	0,81	0,74	0,75	0,12	0,10	0,32	0,76	0,66	1,09
7. O ₁ Kaufbeuren	0,48	0,80	0,62	0,60	-0,16	-0,20	0	-0,21	0,42	0,25	0,19	-0,16	0,04	-0,06	0,66	0,51	0,46
8. O ₁ Burgsteinfurt	1,09	1,29	1,08	1,16	0,02	0,34	0,32	0	0,81	0,70	0,79	0,28	0,33	0,61	1,13	1,19	1,15
9. O ₁ England	0,15	0,08	0,01	0,10	0,11	0,04	-0,03	-0,16	0	-0,02	-0,05	0,04	0,01	0,29	0,16	0,25	0,28
10. O ₁ BFS 1860	0,51	0,32	0,51	0,60	0,20	0,10	0,37	0,16	0,10	0	-0,04	0,29	0,29	0,16	0,51	0,58	0,35
11. O ₁ Lyon	0,22	0,16	0,34	0,81	-0,03	-0,08	0,06	0,15	0,17	0,03	0	0,15	0,28	0,34	0,39	0,27	0,36
12. O ₁ Murchin	0,77	0,94	0,71	1,09	0,11	0,06	0,41	0,21	0,62	0,67	0,70	0	0,28	0,44	0,75	0,62	0,79
13. O ₁ Dänemark	0,65	0,65	0,61	0,91	-0,10	-0,07	0,07	-0,05	0,42	0,45	0,30	-0,16	0	0,17	0,53	0,44	0,62
14. O ₁ Fyn	0,75	0,96	0,76	0,92	0,56	0,37	0,85	0,50	0,44	0,73	0,57	0,58	0,76	0	0,71	0,70	1,00
15. O ₁ Israel	0,85	0,81	0,81	1,30	1,00	0,91	0,85	0,88	0,85	0,77	0,80	0,81	1,00	0,89	0	0,64	0,84
16. O ₁ Österreich	0,78	0,42	0,53	0,87	0,52	0,41	0,49	0,35	0,71	0,53	0,57	0,41	0,52	0,51	0,51	0	0,17
17. O ₁ Wuppertal	0,30	0,44	0,41	0,65	0,36	0,27	0,34	0,29	0,33	0,39	0,36	0,37	0,47	0,58	0,30	-0,04	0

Tab. 13 - Relation zwischen Virusstämmen, ausgedrückt als r-Werte (Meerschweinchen-Hyperimmunseren)

Serum	Virus																
	1. O ₁ Lombardel 1946	2. O ₁ Finistère 1957	3. O ₁ Hannover 1960	4. O ₁ Spanien 1964	5. O ₁ Brant 1965	6. O ₁ Basel 1965	7. O ₁ Kaufbeuren 1966	8. O ₁ Burgsteinfurt 1966	9. O ₁ England 1967	10. O ₁ BFS 1860 1967	11. O ₁ Lyon (1966)	12. O ₁ Murchin 1982	13. O ₁ Dänemark 1982	14. O ₁ Fyn 1983	15. O ₁ Israel 1981	16. O ₁ Austria 1981	17. O ₁ Wuppertal 1982
1. O ₁ Lombardel	1	0,15	0,29	0,47	0,38	0,35	0,50	0,60	0,32	0,42	0,34	0,42	0,51	0,19	0,36	0,32	0,40
2. O ₁ Finistère	0,09	1	0,79	0,03	0,05	0,05	0,05	0,07	0,03	0,05	0,06	0,05	0,02	0,03	0,05	0,08	0,06
3. O ₁ Hannover	0,66	1,07	1	0,32	0,28	0,27	0,52	0,37	0,25	0,27	0,28	0,33	0,28	0,23	0,31	0,48	0,46
4. O ₁ Spanien	0,71	0,79	0,71	1	0,71	0,71	0,78	0,76	0,62	0,54	0,54	0,74	0,32	0,40	0,41	0,72	0,49
5. O ₁ Brant	0,26	0,13	0,17	0,17	1	1,26	0,66	1,58	0,23	0,28	0,25	0,78	0,89	0,44	0,14	0,19	0,12
6. O ₁ Basel	0,13	0,10	0,06	0,19	1,02	1	0,49	0,42	0,15	0,18	0,18	0,76	0,79	0,48	0,17	0,22	0,08
7. O ₁ Kaufbeuren	0,33	0,16	0,24	0,25	1,45	1,58	1	1,62	0,38	0,56	0,65	1,45	0,91	1,15	0,22	0,31	0,35
8. O ₁ Burgsteinfurt	0,08	0,05	0,08	0,07	0,95	0,46	0,48	1	0,15	0,20	0,16	0,52	0,47	0,25	0,07	0,06	0,07
9. O ₁ England	0,71	1,20	0,98	0,79	0,78	0,91	1,07	1,45	1	1,05	1,12	0,91	0,98	0,51	0,69	0,56	0,52
10. O ₁ BFS 1860	0,31	0,48	0,31	0,25	0,63	0,79	0,43	0,69	0,79	1	1,10	0,51	0,51	0,69	0,31	0,26	0,45
11. O ₁ Lyon	0,60	0,69	0,46	0,15	1,07	1,20	0,87	0,71	0,68	0,93	1	0,71	0,52	0,46	0,41	0,54	0,44
12. O ₁ Murchin	0,17	0,11	0,19	0,08	0,78	0,87	0,39	0,62	0,24	0,21	0,20	1	0,52	0,36	0,18	0,24	0,16
13. O ₁ Dänemark	0,22	0,22	0,25	0,12	1,26	1,17	0,85	1,12	0,38	0,35	0,50	1,45	1	0,68	0,30	0,36	0,24
14. O ₁ Fyn	0,18	0,11	0,17	0,12	0,28	0,43	0,14	0,32	0,36	0,19	0,27	0,26	0,17	1	0,19	0,20	0,10
15. O ₁ Israel	0,14	0,15	0,15	0,05	0,10	0,12	0,14	0,13	0,14	0,17	0,16	0,15	0,10	0,13	1	0,23	0,14
16. O ₁ Austria	0,17	0,38	0,30	0,13	0,30	0,39	0,32	0,45	0,19	0,30	0,27	0,39	0,30	0,31	0,31	1	0,68
17. O ₁ Wuppertal	0,50	0,36	0,39	0,39	0,44	0,54	0,46	0,51	0,47	0,41	0,44	0,43	0,34	0,26	0,50	1,10	1

Tab. 14 - Verwandtschaftsgrad zwischen O-Stämmen, ausgedrückt als R-Werte (Meerschweinchen-Hyperimmunseren)

Serum	Virus																
	1. O ₁ Lombardel 1946	2. O ₁ Finistère 1957	3. O ₁ Hannover 1960	4. O ₁ Spanien 1964	5. O ₁ Brent 1965	6. O ₁ Basel 1965	7. O ₁ Kaufbeuren 1966	8. O ₁ Burgsteinfurt 1966	9. O ₁ England 1967	10. O ₁ BFS 1860 1967	11. O ₁ Lyon (1966)	12. O ₁ Murchin 1982	13. O ₁ Dänemark 1982	14. O ₁ Fyn 1983	15. O ₁ Israel 1981	16. O ₁ Austria 1981	17. O ₁ Wuppertal 1982
1. O ₁ Lombardel	100	32	92	58	31	21	41	22	48	36	45	27	33	18	22	23	45
2. O ₁ Finistère		100	92	15	8	7	9	6	19	15	15	7	7	6	9	17	15
3. O ₁ Hannover			100	48	22	13	35	17	50	29	36	25	26	20	22	38	42
4. O ₁ Spanien				100	35	37	44	23	70	37	28	24	20	22	14	31	44
5. O ₁ Brent					100	113	96	122	42	42	52	78	82	35	12	24	23
6. O ₁ Basel						100	88	44	37	38	46	81	96	45	14	29	21
7. O ₁ Kaufbeuren							100	88	64	49	75	75	88	40	18	31	40
8. O ₁ Burgsteinfurt								100	47	37	34	57	73	28	10	16	19
9. O ₁ England									100	91	87	47	61	43	31	33	49
10. O ₁ BFS 1860										100	101	33	42	36	23	28	43
11. O ₁ Lyon											100	38	51	32	26	38	44
12. O ₁ Murchin												100	87	31	16	31	26
13. O ₁ Dänemark													100	34	17	33	29
14. O ₁ Fyn														100	16	25	16
15. O ₁ Israel															100	27	26
16. O ₁ Austria																100	86
17. O ₁ Wuppertal																	100

Mit einem Teil der Virusstämme wurden zum Vergleich auch die Rinderseren im Plaquereduktionstest geprüft. Hierzu wurden sowohl Rekonvaleszentenseren (s. 1.2.5) als auch Seren vakzinierter Tiere benutzt. Die so erhaltenen Werte sind in den Tabellen 15 bis 18 enthalten.

Die Versuche ergaben, daß es sich bei den Rinderseren um Seren unterschiedlicher Qualität handelt und die Immunantwort einzelner Tiere unterschiedlich sein kann. Die Schwankungen sowohl in der Höhe des homologen Titers als auch in der heterologen Reaktion sind unter den gegebenen Voraussetzungen stärker als mit Pools von Meerschweinchen-Hyperimmunseren. Dies wird nicht nur durch den Vergleich der Titer-Differenzen bzw. r-Werte deutlich, sondern auch bei der Betrachtung der R-Werte. So macht z.B. der Verwandtschaftsgrad zwischen O₁BFS 1860 und O₁Kaufbeuren diese Schwankungen deutlich. Im Plaquetest mit Rinderseren beträgt der R-Wert 85%, während er mit Meerschweinchen-Hyperimmunseren auf 49% abfällt. Dasselbe trifft für die R-Werte von O₁Murchin und O₁BFS 1860 (87%/33%), O₁Dänemark 82 und O₁BFS 1860 (80%/42%), O₁Murchin und O₁Lyon (82%/38%) und O₁Dänemark und O₁Lyon (84%/51%) zu.

Tab. 15 - Titer von Rinderseren, ausgedrückt als log SN₉₀

Serum	Virus						
	1. O ₁ Basel	2. O ₁ Kaufbeuren	3. O ₁ BFS 1860	4. O ₁ Laus.-Lyon	5. O ₁ Murchin	6. O ₁ Dänemark	7. O ₁ Fyn
1. O ₁ Basel	1,96	2,00	1,63	1,35	1,76	1,86	1,58
2. O ₁ Kaufbeuren	2,60	2,63	2,72	2,72	2,83	2,82	2,30
3. O ₁ BFS 1860	2,79	2,86	3,09	3,22	2,94	2,91	2,60
4. O ₁ Laus.-Lyon	2,97	2,91	2,85	3,05	2,99	2,97	2,43
5. O ₁ Murchin	3,00	3,03	2,98	2,84	2,95	2,99	1,94
6. O ₁ Dänemark	2,52	2,52	2,60	2,54	2,51	2,61	2,33
7. O ₁ Fyn	2,54	2,49	2,21	1,94	2,31	2,23	2,80

Tab. 16 - Titerdifferenzen zwischen homologer und heterologer Reaktion (Rinderseren)

Serum	Virus						
	1. O ₁ Basel	2. O ₁ Kaufbeuren	3. O ₁ BFS 1860	4. O ₁ Laus.-Lyon	5. O ₁ Murchin	6. O ₁ Dänemark	7. O ₁ Fyn
1. O ₁ Basel	0	-0,04	0,33	0,61	0,20	0,10	0,38
2. O ₁ Kaufbeuren	0,03	0	-0,09	-0,09	-0,20	-0,19	0,33
3. O ₁ BFS 1860	0,30	0,23	0	-0,13	0,15	0,18	0,49
4. O ₁ Laus.-Lyon	0,08	0,14	0,20	0	0,06	0,08	0,62
5. O ₁ Murchin	0,05	-0,08	-0,03	0,11	0	-0,04	1,01
6. O ₁ Dänemark	0,09	0,09	0,01	0,07	0,10	0	0,28
7. O ₁ Fyn	0,26	0,31	0,59	0,86	0,49	0,57	0

Tab. 17 - Relation zwischen Virusstämmen, ausgedrückt als r-Werte (Rinderseren)

Serum	Virus						
	1. O ₁ Basel	2. O ₁ Kaufbeuren	3. O ₁ BFS 1860	4. O ₁ Laus.-Lyon	5. O ₁ Murchin	6. O ₁ Dänemark	7. O ₁ Fyn
1. O ₁ Basel	1	1,10	0,47	0,25	0,63	0,79	0,42
2. O ₁ Kaufbeuren	0,93	1	1,23	1,23	1,58	1,55	0,47
3. O ₁ BFS 1860	0,50	0,59	1	1,35	0,71	0,66	0,32
4. O ₁ Laus.-Lyon	0,83	0,72	0,63	1	0,87	0,83	0,24
5. O ₁ Murchin	0,89	1,20	1,07	0,78	1	1,10	0,10
6. O ₁ Dänemark	0,81	0,81	0,98	0,85	0,79	1	0,52
7. O ₁ Fyn	0,55	0,49	0,26	0,14	0,32	0,27	1

Tab. 18 - Verwandtschaftsgrad zwischen O₁-Stämmen, ausgedrückt als R-Wert (Rinderseren)

Serum	Virus						
	1. O ₁ Basel	2. O ₁ Kaufbeuren	3. O ₁ BFS 1860	4. O ₁ Laus.-Lyon	5. O ₁ Murchin	6. O ₁ Dänemark	7. O ₁ Fyn
1. O ₁ Basel	100	101	48	46	75	80	48
2. O ₁ Kaufbeuren		100	85	94	138	112	48
3. O ₁ BFS 1860			100	92	87	80	29
4. O ₁ Laus.-Lyon				100	82	84	18
5. O ₁ Murchin					100	93	18
6. O ₁ Dänemark						100	37
7. O ₁ Fyn							100

2.2.5.1 Antigenprofile zur Charakterisierung von MKS-Virusstämmen der O₁ Gruppe

Um MKS-Virusstämme, die in einem größeren Rahmen zur O₁ Gruppe innerhalb des Typs O zählen, untereinander in einem serologischen Test zu vergleichen, wurden die Reaktionen eines Virusstammes mit dem jeweiligen homologen und den heterologen Antiseren untersucht.

Aus den Titerdifferenzen (Tab. 12) von heterologen und homologen mit Meerschweinchen-Hyperimmunseren gegen 17 verschiedene Isolate durchgeführten Plaquereduktionstests wurden Antigenprofile erstellt, die in den Abb. 7 bis 15 dargestellt sind.

Wie schon zuvor erläutert (s. 1.2.9.1), zeigt eine Titer-Differenz von $> 0,2 \log_{10}$ zwischen den $\log SN_{90}$ -Werten verschiedener Stämme mit 5% Irrtumswahrscheinlichkeit einen signifikanten Unterschied an.

Die Antigenprofile in den Abbildungen 7 bis 15 veranschaulichen die zuvor erwähnte Einteilung von Virusstämmen innerhalb der O₁ Gruppe. In diesen Profilen werden unilaterale Relationen der einzelnen Virusstämme gezeigt. Im Vergleich der Antigenprofile untereinander jedoch werden auch bilaterale Verwandtschaften deutlich.

Betrachtet man das Antigenprofil von O₁Lombardei, so wird eine Ähnlichkeit zwischen O₁Lombardei, O₁Hannover, O Spanien und O₁England ersichtlich, aber keine zwischen dem Referenzstamm und O Finistère. Das Antigenprofil des MKSV-Stammes O Finistère zeigt hingegen eine enge Verwandtschaft sowohl mit O₁Lombardei als auch mit den anderen genannten Isolaten. Der Vergleich der Profile von O₁Lombardei und O Finistère ergibt im übrigen eine weitgehende Übereinstimmung, mit der Ausnahme der zuvor beschriebenen nur unilateralen Verwandtschaft zwischen diesen beiden Stämmen (s. 2.2.4). Auch zwischen O Finistère und O₁Hannover besteht neben der bilateralen Verwandtschaft eine große Ähnlichkeit zwischen den für beide Isolate erstellten Antigenprofilen, bis auf die heterologen Reaktionen mit dem Serum gegen O₁BFS 1860 und O₁Lyon.

O₁ Spanien und O₁ England weisen untereinander eine fast vollständige Übereinstimmung auf, und die durch sie induzierten Antikörper reagieren mit den meisten heterologen O₁ Stämmen recht gut.

Die von 1965 bis 1967 während des letzten großen Seuchenzugs in Westeuropa isolierten Stämme O₁ Brent, O₁ Lyon (Lausanne), O₁ Kaufbeuren, O₁ Burgsteinfurt und O₁ BFS 1860 ergaben weitgehend ähnliche Profile; diese weisen aber untereinander einige Abweichungen auf. So zeigt z.B. der MKSV-Stamm O₁ Brent gegenüber O₁ Kaufbeuren und O₁ Burgsteinfurt Homologien auf, aber es treten unterschiedliche Reaktionen mit anderen Isolaten aus den 60er Jahren auf.

O₁ Brent und O₁ Basel stimmen in den heterologen Reaktionen mit den Seren der anderen Virusstämme, mit Ausnahme von O₁ Burgsteinfurt, gut überein. O₁ Brent und O₁ Basel reagieren auch gut mit den Seren O₁ England, O₁ BFS 1860 und O₁ Lyon, obwohl deren Antigenprofil stark abweichen.

O₁ Kaufbeuren unterscheidet sich von O₁ Brent und O₁ Basel in 4 heterologen Serumtitern, nämlich in der Reaktion mit den Seren gegen O₁ Basel, O₁ Burgsteinfurt, O₁ BFS 1860 und O₁ Murchin. Da es sich bei O₁ Kaufbeuren um einen Klon handelt, könnten die Abweichungen, welche gegenüber anderen Isolaten aus demselben Seuchenzug gefunden wurden, dieser Tatsache zuzuschreiben sein.

O₁ Burgsteinfurt paßt trotz einiger Abweichungen im Antigenprofil zur Gruppe der Isolate aus dem Seuchenzug der 60er Jahre. Dieser Stamm zeigt mit den Stämmen O₁ England, O₁ BFS 1860 und O₁ Lyon (SP-Stämme) nur einseitig eine enge Verwandtschaft.

O₁ BFS 1860 und O₁ England sind nahezu identisch, und es könnte sich um zwei verschiedene Zellkultur-Derivate aus demselben Virusisolat handeln. Beide Stämme stimmen auffallend mit O₁ Lyon überein. O₁ Murchin und O₁ Dänemark, beide 1982 für Ausbrüche in der DDR und in Dänemark verantwortlich, weisen einen hohen Verwandtschaftsgrad auf und sind den Stämmen O₁ Brent, O₁ Burgsteinfurt und O₁ Kaufbeuren ähnlich. Die aufgefundenen Abweichungen von O₁ Kaufbeuren könnten

wiederum damit erklärt werden, daß es sich bei O₁Kaufbeuren um kloniertes Virus handelt.

O Austria und O Wuppertal sind untereinander nahe verwandt und bilden eine eigene Gruppe. Eine einseitig enge Verwandtschaft besteht zu O₁Hannover und O Spanien, sowie zu den SP-Stämmen O₁England und O₁Lyon.

Das 1983 auf der dänischen Insel Fünen isolierte Virus O₁Fyn'83 zeigt ein abweichendes Antigenprofil. Einseitig wurde eine gute Reaktion mit Seren gegen O₁Kaufbeuren, O₁BFS 1860 und O₁Dänemark '82 gefunden. Betrachtet man aber die Antigenprofile der anderen Stämme, so fällt auf, daß sich der Stamm O₁Fyn'83 ebenso wie O Israel, O Austria und O Wuppertal von den O₁-Stämmen der Jahre 1964-67 abhebt.

O Israel weist eine unilaterale Relation zu O₁England auf, weicht aber in den übrigen heterologen Reaktionen stark ab. Zum Stamm O Austria weist O Israel zwar keine enge Verwandtschaft auf, beide Stämme zeigen jedoch einige Ähnlichkeiten in den Antigenprofilen.

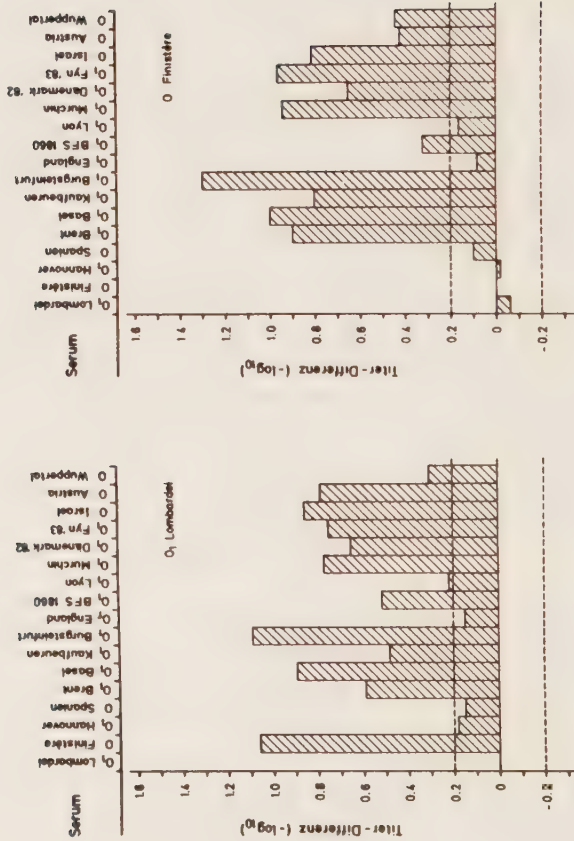


Abb. 7 - Antigenprofile der MKS-Virusstämme O₁ Lombard und O Finistère.

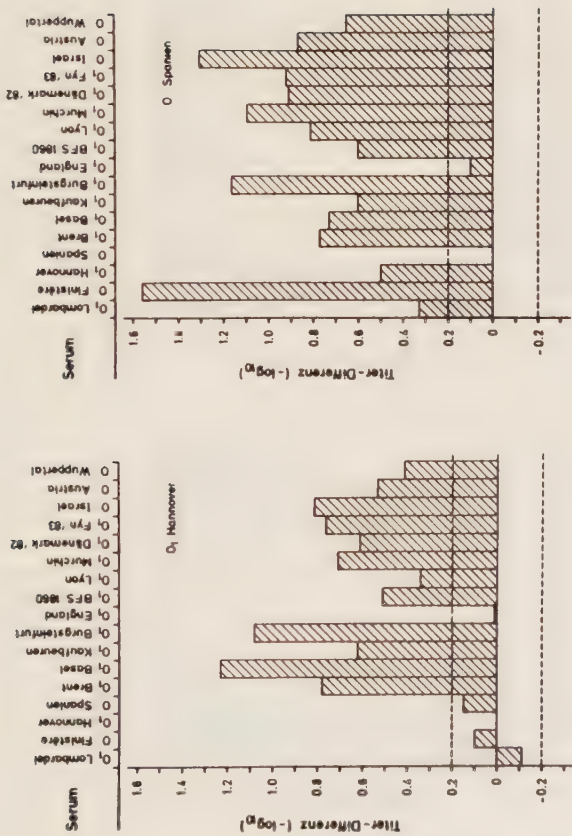


Abb. 8 - Antigenprofile der MKS-Virusstämme O₁Hannover und O₁Spanien.

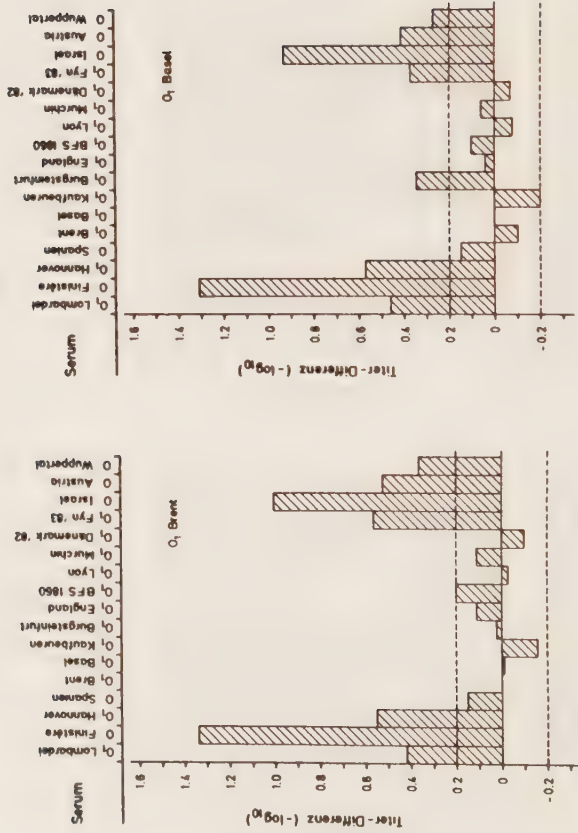


Abb. 9 - Antigenprofile der MKS-Virusstämme O₁Brent und O₁Basel.

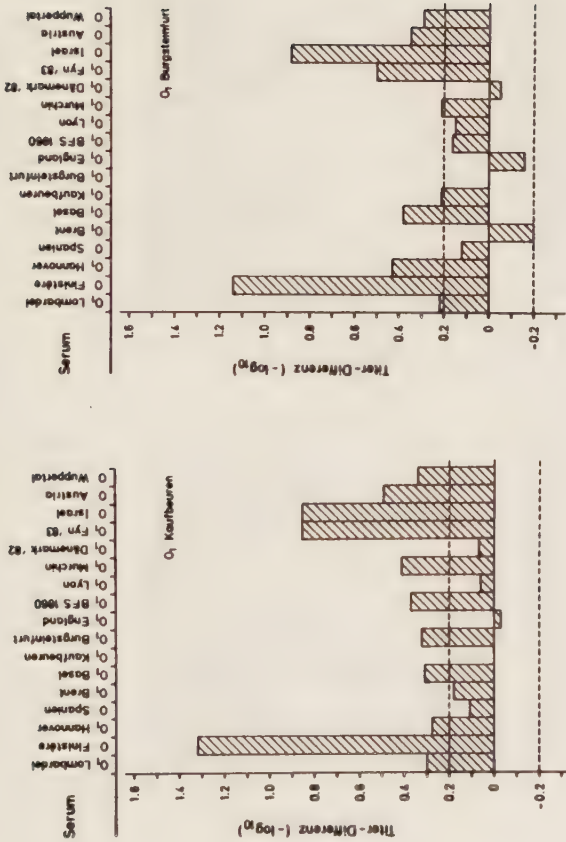


Abb. 10 - Antigenprofile der MKS-Virusstämme O₁ Kaufbeuren und O₁ Burgsteinfurt.

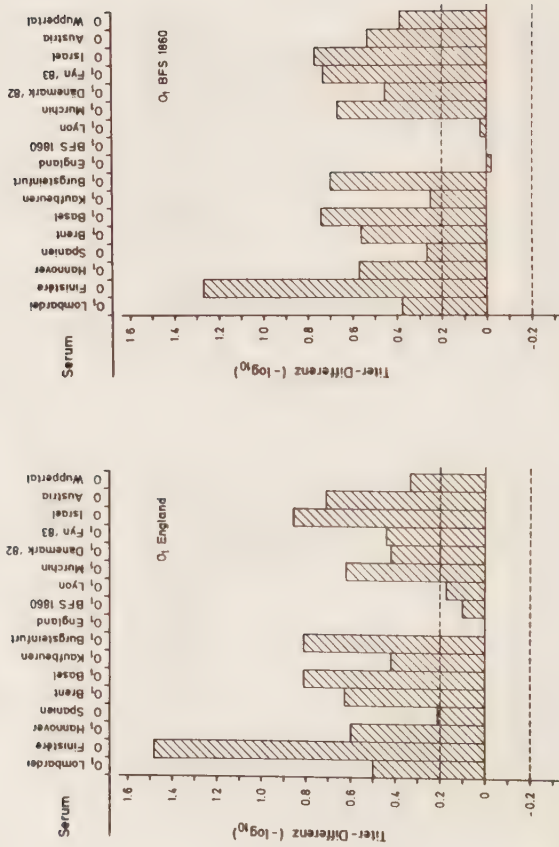


Abb. 11 - Antigenprofile der MKS-Virusstämme O₁ England und O₁ BFS 1860.

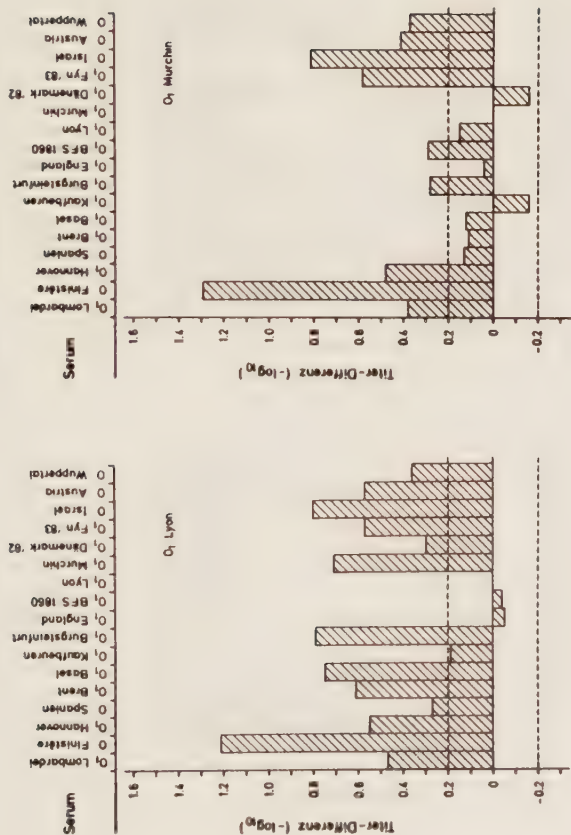


Abb. 12 - Antigenprofile der MKS-Virusstämme O₁Lyon und O₁Murchin.

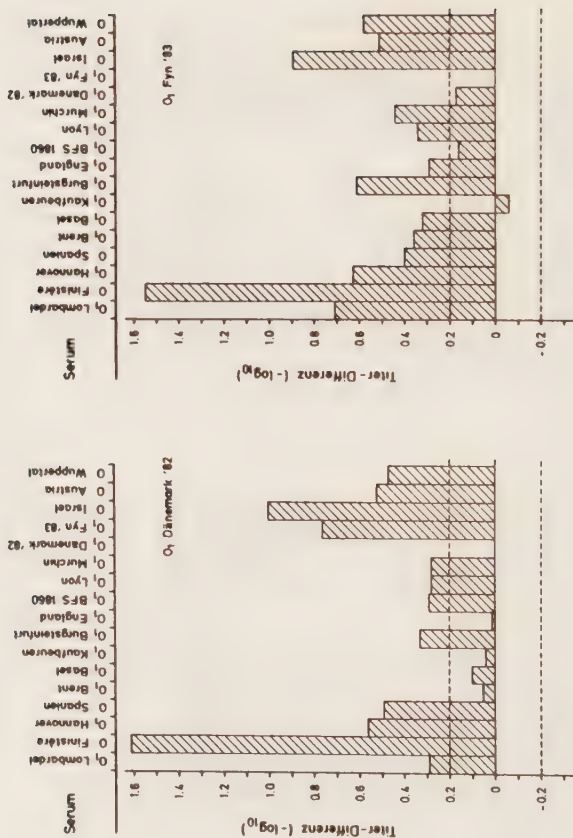


Abb. 13 - Antigenprofile der MKS-Virusstämme O₁ Dänemark '82 und O₁ Fyn '83.

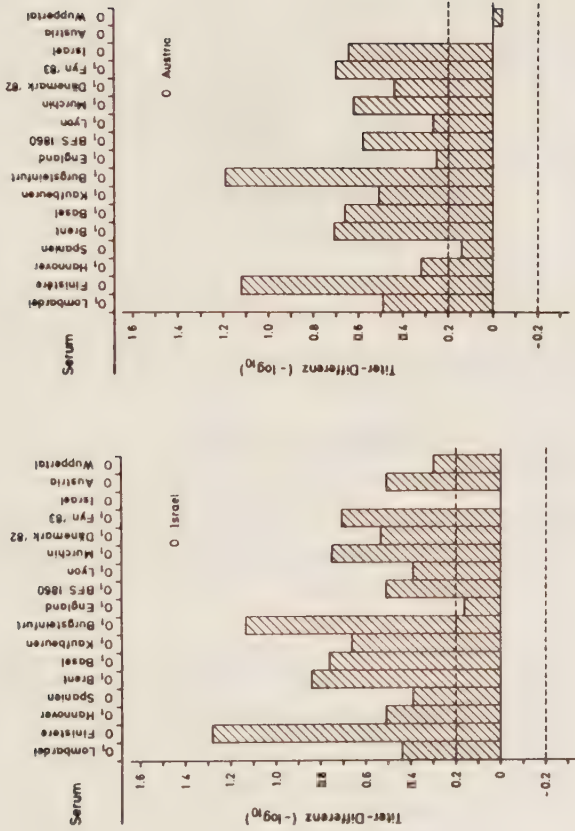


Abb. 14 - Antigenprofile der MKS-Virusstämme O Israel und O Austria.

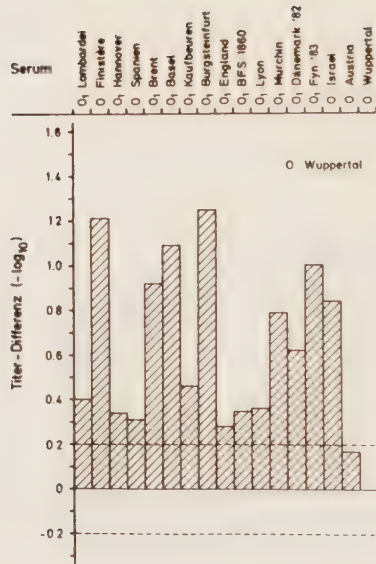


Abb. 15 - Antigenprofil des MKS-Virusstammes O Wuppertal.

2.2.5.2 r-Wert-Profile im Vergleich zu Profilen aus Titer-Differenzen

Wie in 2.2.5.1 aufgeführt, wurde die Darstellung der Titer-Differenzen (in $\log_{10}$) ausgewählt, um Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den untersuchten Virusisolaten auszudrücken.

Der wesentliche Grund hierfür war, daß alle Titer und dementsprechend auch die Standardabweichungen und Konfidenzbereiche als $\log_{10}$ -Werte berechnet wurden und im Vergleich von negativen und positiven Abweichungen ohne Verzerrung, wie sie bei der Umrechnung in numerische Werte auftreten, abgebildet werden können. Es ist aber darauf hinzuweisen, daß viele Autoren die Verwandtschaftsbeziehung zwischen MKS-Virusstämmen als r-Werte ausdrücken (Arrowsmith & Hedger, 1982; Brooksby, 1968; Lombard, 1981; Rweyemamu, 1984; Wittmann, 1964).

Dieses könnte auf der Arbeit von Archetti & Horsfall (1950) für die Darstellung der Verwandtschaftsbeziehungen zwischen Influenzavirus-Stämmen basieren, in welcher der Verwandtschaftsgrad als $r = \sqrt{r_1 \times r_2}$ ausgedrückt wird, wobei von 1,0 abweichende Werte einen Unterschied zwischen den untersuchten Varianten anzeigen. Dieser r-Wert entspricht dem in den Arbeiten der oben genannten Autoren aufgeführten R-Wert. Dieser ist, oft auch in Prozent, numerisch ausgedrückt, wodurch sich die Notwendigkeit der Umrechnung der Serumtitern, bzw. Titerunterschiede in numerische Werte ergibt. Entsprechend der Definition $r = \frac{\text{heterologer Serumtiter}}{\text{homologer Serumtiter}}$

ergibt sich für die homologe Reaktion der r-Wert 1,0, entsprechend einer Titer-Differenz (in $\log_{10}$) gleich null.

Um die Unterschiede zwischen den beiden Darstellungen zu veranschaulichen, sind in Abbildung 16 die Antigenprofile der Virusstämme O Finistère und O₁Brent anhand von r-Werten wiedergegeben. Aus diesem Vergleich (siehe auch Abb. 7 und 9) ist zu ersehen, daß die r-Werte jeweils hoch sind, wenn die Differenzen kleine Werte aufweisen.

Wie schon erwähnt (1.2.9.1), liegt der Signifikanzbereich für Titer-Differenzen bei $\pm 0,2 \log_{10}$. Diese Symmetrie ist bei der Darstellung der Antigenprofile anhand von r-Werten nicht vorhanden. Signifikant von 1,0 abweichende Werte würden für die r-Werte bei 0,63 bzw. 1,58 liegen.

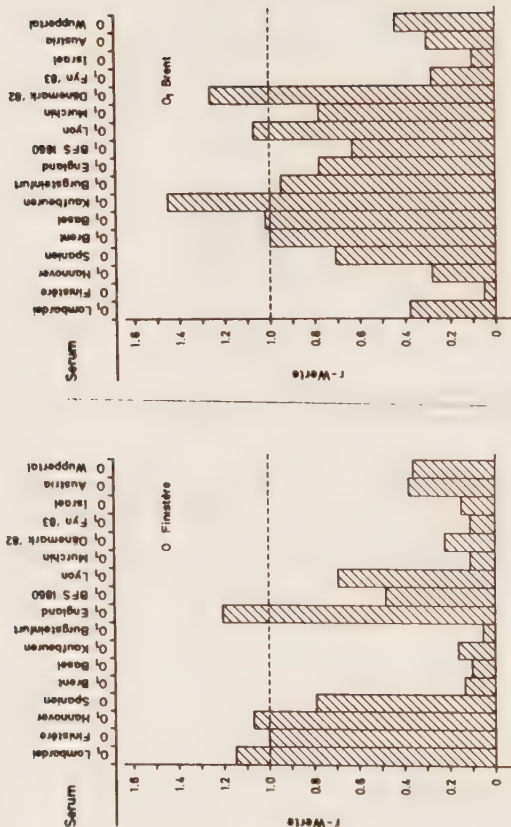


Abb. 16 - Antigenprofile der MKS-Virusstämme
O Finstère und O₁ Brent dargestellt als r-Werte.

2.2.5.3 Antikörperprofile zur Darstellung der Antikörperspektren von Immunseren

Während das Antigenprofil für die Subtypendiagnose eines Virusisolats oder seine Zuordnung zu einer Gruppe von Virusstämmen von Nutzen ist, kann in der zweiten Dimension das Antikörperprofil, das aus den Reaktionen eines Immunserums mit dem homologen und verschiedenen aktuellen Virusisolaten erstellt wird, für die Auswahl eines Virus zur Vakzineherstellung dienlich sein. Die Antikörperprofile der untersuchten Meerschweinchen-Hyperimmunseren ergeben sich aus Tabelle 12 bei zeilenweiser Ablesung.

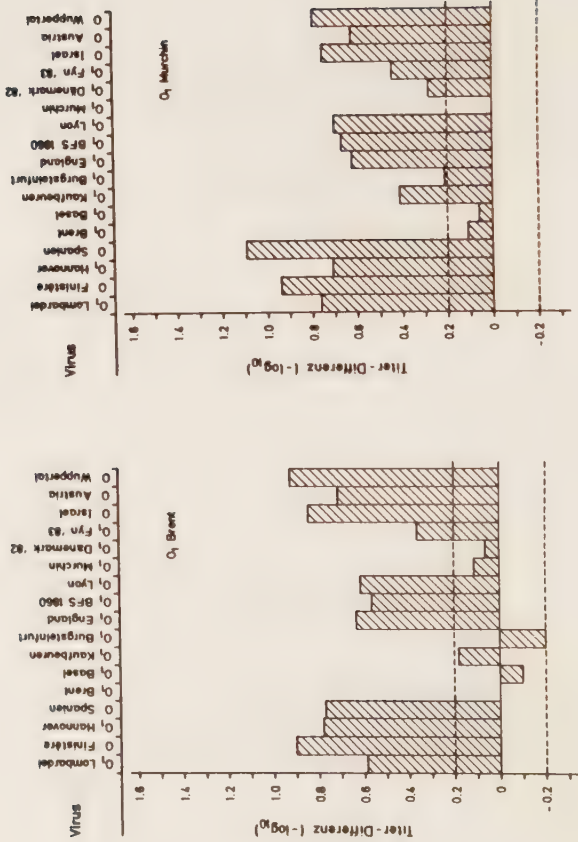


Abb. 17 - Antikörperprofile der MKS-Virusstämme O₁Brent und O₁Murchin.

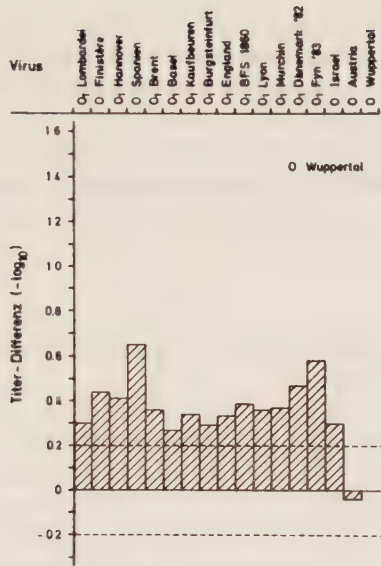


Abb. 18 - Antikörperprofil des
MKS-Stammes O Wuppertal

Als Auszug aus dieser Tabelle sind die Reaktionen der Meerschweinchen-Hyperimmunseren gegen O₁Brent, O₁Murchin und O Wuppertal mit den in 1.1.3 aufgezählten Virusstämmen dargestellt.

Das Antikörperprofil von O₁Brent zeigt eine gute Reaktion des durch diesen Virusstamm induzierten Hyperimmunserums mit den MKSV-Isolaten aus den 60er Jahren, mit Ausnahme von O₁England, O₁BFS 1860 und O₁Lyon. Der hohe Verwandtschaftsgrad zwischen den Virusstämmen O₁Dänemark'82, O₁Murchin und den Isolaten der 60er Jahre, der in den Antigenprofilen ersichtlich ist, wird durch die Reaktion dieser Stämme mit dem Serum O₁Brent bestätigt.

Das Antikörperprofil von O₁Murchin zeigt, daß durch diesen Stamm induzierte Antikörper sowohl O₁Brent als auch O₁Basel gleich gut neutralisieren. Eine etwas schwächere Reaktion wurde mit den Isolaten O₁Burgsteinfurt und O₁Dänemark gemessen.

Betrachtet man das Antikörperprofil von O Wuppertal, so wird die Ver-

wandschaft mit O Austria erneut deutlich. Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, bewirken Antikörper gegen O Wuppertal mit keinem der aufgeführten Virusstämme eine vergleichbar gute Neutralisation.

Antikörperprofile erlauben also eine Abschätzung darüber, ob die durch Vakzination mit einem bestimmten Virusstamm in einer Rinderpopulation induzierte Immunität auch gegen neu auftretende Virusisolate als ausreichend anzusehen ist.

2.2.6 Identifizierung eines neuen Virusisolates: O₁Zusmarshausen

Im Oktober 1984 wurden Füße und Hautstücke mit Läsionen von MKS-verdächtigen Schweinen an die BFA Tübingen zur Diagnose gesandt. Da die Hautstücke mit Veränderungen nur sehr klein waren und nicht genügend Antigen für eine Diagnose mittels KBR enthielten, wurde eine Typisierung erst nach der Virusisolierung im Suspensionsplaquetest in BHK-CT-Zellen möglich. Aus den Schälchen wurden die Plaques isoliert, homogenisiert und zur Typisierung in der KBR verwendet sowie auf BHK-CT-Zellkulturen verimpft. Diese Zellkulturpassage ermöglichte die Subtypendiagnose im Plaquereduktionstest.

Erste Versuche mit verschiedenen O-Subtypen ergaben eine Zugehörigkeit zum Subtyp O₁. Aus der nächsten Zellkulturpassage wurde das Virus wie beschrieben gereinigt und zur Herstellung eines spezifischen Meerschweinchen-Hyperimmunserums verwendet (s. 1.2.3 und 1.2.5).

Unterdessen wurde der O₁Stamm, der nach dem Ort des Ausbruchs als O₁Zusmarshausen bezeichnet wurde, mit Meerschweinchen-Hyperimmunseren gegen die in 1.1.3 aufgezählten O₁-Virusstämme getestet. Es wurde ein Antigenprofil erstellt, das eine große Ähnlichkeit zwischen O₁Zusmarshausen und Isolaten aus den 60er Jahren sowie eine große Ähnlichkeit mit O₁Murchin und O₁Dänemark'82 zeigt (Abb. 19). Eine Übereinstimmung zwischen O₁Zusmarshausen und O Austria, O Wuppertal, O₁Fyn 83 sowie dem aus dem Nahen Osten stammenden O Israel wurde nicht festgestellt.

In Tabelle 19 ist die Relation zwischen O₁Zusmarshausen und 17 anderen O-Isolaten in Form von r-Werten ausgedrückt. Da zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit noch keine Ergebnisse bezüglich des Seruntiters vom Meerschweinchen-Hyperimmunserum O₁Zusmarshausen gegen die genannten O₁-Stämme vorlagen, war die Berechnung der R-Werte nicht möglich.

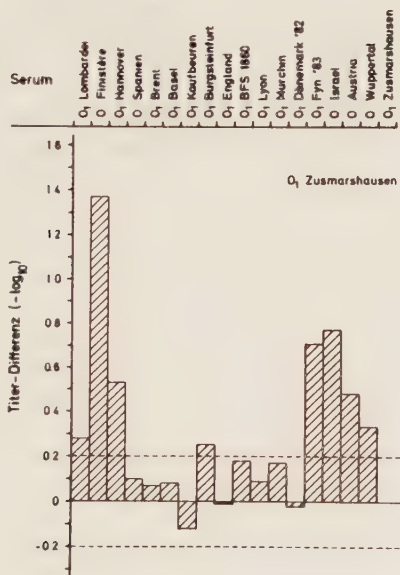


Abb. 19 - Antigenprofil des Virusisolats
O₁Zusmarshausen (1984).

Tab. 19 - r-Werte des Virus O₁Zusmarshausen (1984) in Bezug auf
Meerschweinchen-Hyperimmunserum gegen verschiedene O-Stämme

Virus		Virus	
Serum	O ₁ Zusmarshausen	Serum	O ₁ Zusmarshausen
O ₁ Lombardei	r = 0,52	O ₁ BFS 1860	r = 0,66
O Finistère	r = 0,04	O ₁ Lyon	r = 0,81
O ₁ Hannover	r = 0,30	O ₁ Murchin	r = 0,68
O Spanien	r = 0,79	O ₁ Dänemark'82	r = 1,05
O ₁ Brent	r = 0,85	O ₁ Fyn'83	r = 0,19
O ₁ Basel	r = 0,83	O Israel	r = 0,17
O ₁ Kaufbeuren	r = 1,32	O Austria	r = 0,33
O ₁ Burgsteinfurt	r = 0,56	O Wuppertal	r = 0,47
O ₁ England	r = 1,02		

2.2.7 Antigenprofilen von Klone des Virusstamms O₁Lausanne

Wie zuvor erwähnt, wurden vom dem Stamm O₁Lyon sowohl aus dem Zellkulturvirus als auch aus einer Passage im Rind verschiedene Plaqueklone isoliert und mit einer Gruppe anderer Klone und Isolate, die unter der Bezeichnung O₁Lausanne geführt werden, verglichen. Diese betrafen zwei "O₁Lausanne" Stämme aus der BFA Tübingen und den Stamm O₁Lausanne '65, der vom Wellcome Foot-and-Mouth Disease Laboratory in Pirbright erhalten wurde. Die Kreuzreaktionen der zweiten Passage dieser Klone wurden mit spezifischen Meerschweinchen-Hyperimmunseren in Plaquereduktionstests gemessen. In Tabelle 20 und 21 sind die heterologen und homologen Serumtiter sowie die Titer-Differenzen enthalten.

Die in Abbildung 20 bis 25 dargestellten Antigenprofile wurden wiederum als Titerdifferenz ($-\log_{10}$) zwischen heterologem und homologem Serumtiter dargestellt.

Tab. 20 - Titer von Meerschweinchen-Hyperimmunseren, ausgedrückt in log SN₅₀

Serum	Virus										
	1. O ₁ Lyon	2. O ₁ Lausanne Lyon, Cl 165	3. O ₁ Lausanne Lyon, Cl 240	4. O ₁ Lausanne Lyon, Cl 248 SP	5. O ₁ Lausanne Lyon, Cl 249 LP	6. O ₁ Lausanne, Cl 197 SP	7. O ₁ Lausanne, Cl 199 LP	8. O ₁ Lausanne, Rd 696	9. O ₁ Lausanne, Rd 696, Cl 191	10. O ₁ Lausanne '65	11. O ₁ Lausanne '65, Cl 226 LP
1. O ₁ Lyon	4,20	4,37	4,36	4,44	4,27	4,09	4,28	4,29	4,03	4,22	4,12
2. O ₁ Lausanne Lyon, Cl 165	3,98	4,06	3,97	4,01	3,80	3,59	3,69	3,91	3,77	3,77	3,63
3. O ₁ Lausanne Lyon, Cl 240	3,94	3,78	4,24	3,96	4,20	3,64	4,09	3,96	3,73	3,83	3,75
4. O ₁ Lausanne Lyon, Cl 248 SP	3,80	3,85	3,93	3,94	3,72	3,53	3,60	3,69	3,55	3,58	3,61
5. O ₁ Lausanne Lyon, Cl 249 LP	4,21	4,11	4,37	4,19	4,11	3,79	4,04	4,03	3,86	4,03	4,03
6. O ₁ Lausanne, Cl 197 SP	3,21	3,05	3,33	3,07	2,89	4,13	3,23	3,05	4,16	2,96	3,21
7. O ₁ Lausanne, Cl 199 LP	3,83	3,71	3,89	3,53	4,31	3,99	4,34	4,35	4,01	4,26	4,19
8. O ₁ Lausanne, Rd 696	3,50	3,50	3,49	3,72	3,83	3,81	4,19	4,02	3,69	3,89	3,91
9. O ₁ Lausanne, Rd 696, Cl 191	3,30	3,16	3,36	3,30	3,10	3,68	3,48	3,43	3,80	3,34	3,27
10. O ₁ Lausanne '65	3,58	3,53	3,74	3,44	3,65	3,76	4,17	4,19	3,77	4,10	4,07
11. O ₁ Lausanne '65, Cl 226 LP	2,95	2,98	3,11	2,94	3,10	3,10	3,62	3,60	3,22	3,60	3,70

Tab. 21 - Titer-Differenzen zwischen homologer und heterologer Reaktion

Virus												
Serum	1. O ₁ Lyon	2. O ₁ Lausanne Lyon, CI 165	3. O ₁ Lausanne Lyon, CI 240	4. O ₁ Lausanne Lyon, CI 248 SP	5. O ₁ Lausanne Lyon, CI 249 LP	6. O ₁ Lausanne, CI 197 SP	7. O ₁ Lausanne, CI 199 LP	8. O ₁ Lausanne, Rd 696	9. O ₁ Lausanne, Rd 696, CI 191	10. O ₁ Lausanne '65	11. O ₁ Lausanne '65, CI 226 LP	
1. O ₁ Lyon	0	-0,17	-0,16	-0,24	-0,07	0,11	-0,08	-0,09	0,17	-0,02	0,08	
2. O ₁ Lausanne Lyon, CI 165	0,08	0	0,09	0,05	0,26	0,47	0,37	0,15	0,29	0,29	0,43	
3. O ₁ Lausanne Lyon, CI 240	0,30	0,46	0	0,28	0,04	0,60	0,15	0,28	0,51	0,41	0,49	
4. O ₁ Lausanne Lyon, CI 248 SP	0,14	0,09	0,01	0	0,22	0,41	0,34	0,25	0,39	0,36	0,33	
5. O ₁ Lausanne Lyon, CI 249 LP	-0,10	0	-0,26	-0,08	0	0,32	0,07	0,08	0,25	0,08	0,08	
6. O ₁ Lausanne, CI 197 SP	0,92	1,08	0,80	1,06	1,24	0	0,90	1,08	-0,03	1,17	0,92	
7. O ₁ Lausanne, CI 199 LP	0,51	0,63	0,45	0,81	0,03	0,35	0	-0,01	0,33	0,08	0,15	
8. O ₁ Lausanne, Rd 696	0,52	0,52	0,53	0,30	0,19	0,21	-0,17	0	0,33	0,13	0,11	
9. O ₁ Lausanne, Rd 696, CI 191	0,50	0,64	0,44	0,50	0,70	0,12	0,32	0,37	0	0,46	0,53	
10. O ₁ Lausanne '65	0,62	0,57	0,36	0,66	0,45	0,34	-0,07	-0,09	0,33	0	0,03	
11. O ₁ Lausanne '65, CI 226 LP	0,75	0,72	0,59	0,76	0,60	0,60	0,08	0,10	0,48	0,10	0	

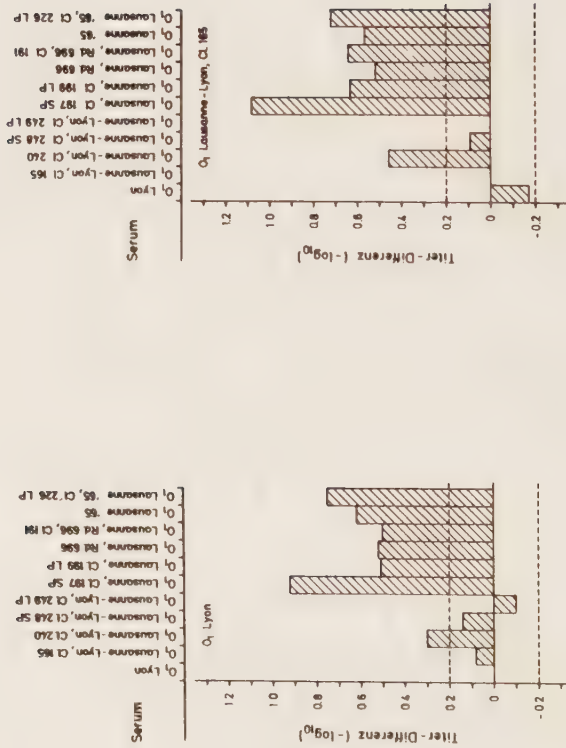


Abb. 20 - Antigenprofile der MKSV-Plaqueisolate
O₁ (Lausanne-)Lyon und O₁ Lausanne-Lyon, CI 165.

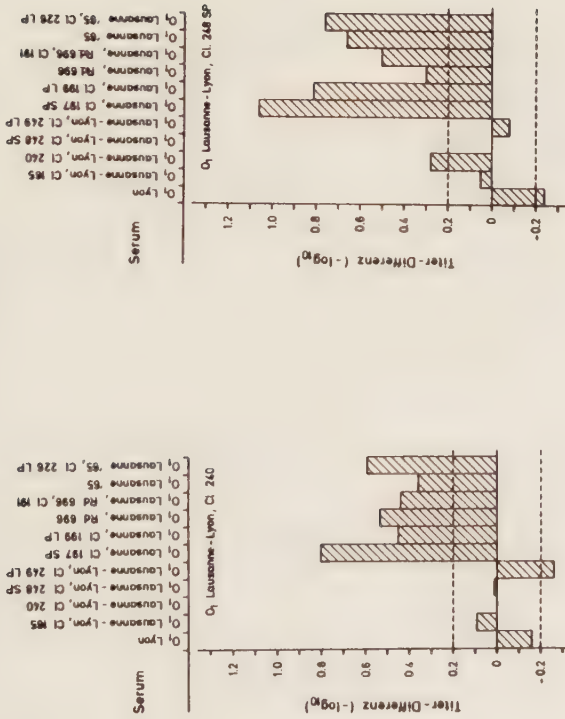


Abb. 21 - Antigenprofile der MKSV-Plaquesolates
O₁Lausanne-Lyon, CI 240 und O₁Lausanne-Lyon, CI 248 SP.

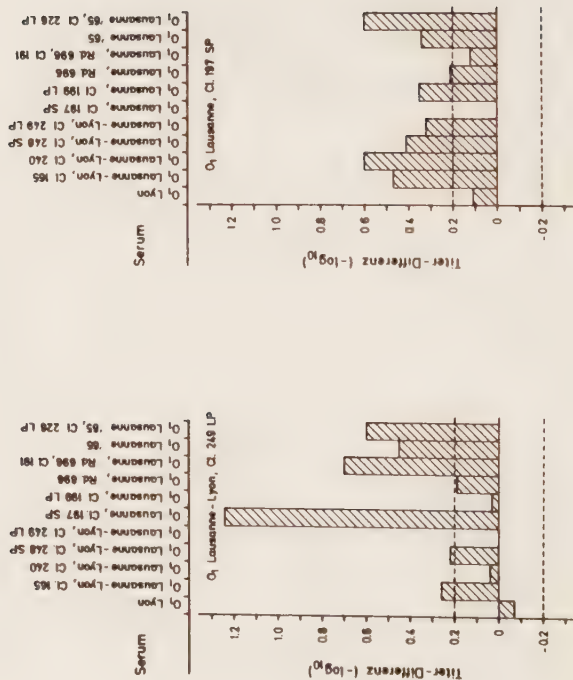


Abb. 22 - Antigenprofile der MKSV-Plaquesisolate
O₁Lausanne-Lyon, CI 249 LP und O₁Lausanne, CI 197 SP.

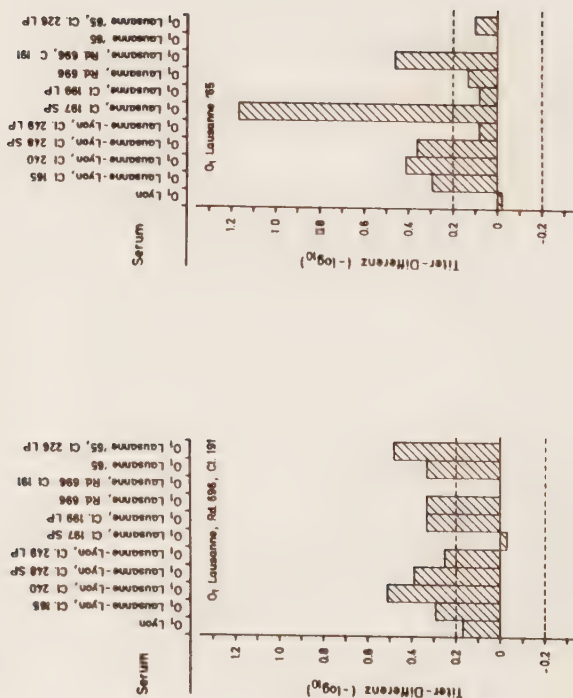


Abb. 24 - Antigenprofile der MKSV-Plaqueisolate
O₁ Lausanne, Rd 696 Cl 191 und O₁ Lausanne '65.

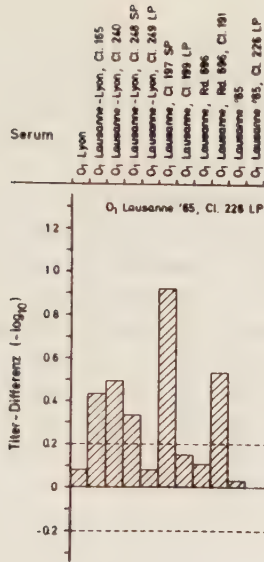


Abb. 25 - Antigenprofil des MKSV-Plaueisolats O₁Lausanne'65,
Cl 226 LP.

Anhand der in den Abbildungen dargestellten Antigenprofile kann man eine grobe Einteilung der untersuchten Klone des Virusstammes O₁Lyon, bzw. O₁Lausanne vornehmen.

Die erste Gruppe besteht aus den Klonen (Cl) 165, 240, 248 SP und 249 LP, die zweite aus Cl 197 SP, 199 LP, Rd 696 und Rd 696 Cl 191, und die zwei Plaueisolate des Virus O₁Lausanne '65 bilden die dritte Gruppe.

Betrachtet man das Antigenprofil des Virusstammes O₁Lyon, so ist eine weitgehende Ubereinstimmung zwischen diesem und den daraus abgeleiteten folgenden vier Klonen festzustellen. Es ergeben sich aber einzelne signifikante Unterschiede. Die Klone Cl 165 und Cl 240 sind ebenfalls im Profil sehr ähnlich, obwohl Cl 165 und Cl 240 im direkten Vergleich nur einseitig gut reagieren. Cl 248 SP bildet wie O₁Lyon kleine Plaques, und beide werden durch einen monoklonalen Antikörper gegen O₁Kaufbeuren neutralisiert; trotzdem ergaben sich einige Unterschiede in der heterologen Reaktion mit den anderen Klonen, insbesondere mit Rd 696. Der Klon Cl

249 LP zeigt dagegen eine gute Reaktion mit den Klonen Cl 199 LP und Rd 696, die beide große Plaques in unserem System bilden, aber wiederum nicht mit O₁Lausanne '65 und dem daraus abgeleiteten Cl 226 LP. Auffallend ist die hohe Titerdifferenz zu Cl 197 SP und Cl 191.

In der zweiten Gruppe bilden die Klone Cl 197 SP und 191 relativ kleine und scharfrandige Plaques, aber diese Klone werden nicht durch den monoklonalen Antikörper gegen O₁Kaufbeuren neutralisiert. Es paßt zu diesen gemeinsamen Merkmalen, daß diese Klone sehr ähnliche Antigenprofile aufweisen und weder mit Cl 199 LP und Rd 696 noch mit den anderen Klonen der übrigen Gruppen gut reagieren, mit Ausnahme von O₁Lyon. Andererseits wiesen aus der zweiten Gruppe die Klone Cl 199 LP und Rd 696 ebenfalls eine weitgehende Identität in den Antigenprofilen auf, die durch die gute Reaktion mit den Seren gegen die Klone gekennzeichnet ist, die große Plaques bilden.

Aus den Antigenprofilen von O₁Lausanne '65 und Cl 226 LP ist eine nahe Verwandtschaft zu Cl 199 LP und Rd 696 abzuleiten. Beide Klone reagieren schlecht mit Seren gegen die SP-Klone Cl 197 SP und Cl 191, aber auffallend gut mit O₁Lyon-Serum.

Aus diesen Vergleichen von Plaqueisolaten des Virusstammes O₁Lausanne wird deutlich, in welchem Umfang in den verschiedenen Wirtssystemen, sei es in Zellkulturen oder in empfänglichen Tieren, Mutationen auftreten können, die eine unterschiedliche Immunantwort im Tier ergeben und abweichende serologische Reaktionen zeigen.

2.2.8 Monoklonale Antikörper gegen O₁Kaufbeuren

Durch die zur Verfügung gestellten monoklonalen Antikörper gegen den MKS-Virusstamm O₁Kaufbeuren, 7. Passage aus BHK-21-Kulturen, war es möglich, die Verwandtschaft der untersuchten Virusstämme erneut zu überprüfen. Folgende Virusstämme wurden im Plaquereduktionstest geprüft: O Finistère, O₁Brent, O₁Basel, O₁Kaufbeuren Cl 93, O₁Burgsteinfurt, O₁BFS 1860, O₁Lyon, O₁Murchin, O₁Dänemark '82, O₁Fyn '83, O Israel, O Austria, O Wuppertal sowie die Klone O₁Lausanne-Lyon Cl 248 SP, O₁Lausanne Cl 197 SP, O₁Lausanne Rd 696 Cl 191(SP), außerdem das

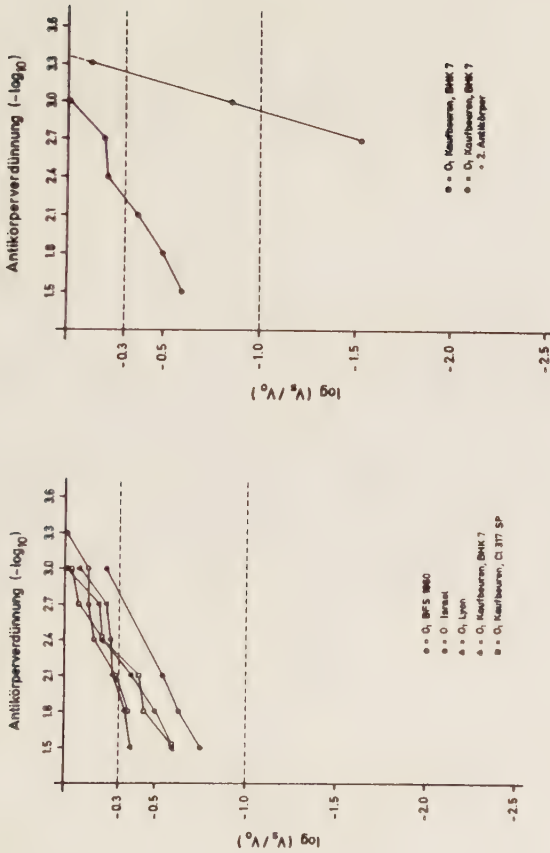
Virus O₁Kaufbeuren 7. BHK und die daraus abgeleiteten Klone Cl 317 SP und Cl 316 LP.

Die Resultate zeigten, daß von diesen Virusstämmen nur solche, die kleine Plaques bildeten, mit den monoklonalen Antikörpern reagierten, nämlich: O₁BFS 1860, O₁Lyon, O Israel und O₁Lausanne-Lyon Cl 248 SP (Abb. 26). Ferner wurde der Stamm O₁Kaufbeuren 7. BHK und der daraus abgeleitete Klon Cl 317 SP von den monoklonalen Antikörpern erkannt, nicht hingegen der vom Stamm O₁Kaufbeuren 7. BHK abgeleitete Klon Cl 316 LP, der große Plaques bildet. Es ist anzunehmen, daß dieser monoklonale Antikörper nur solches Virus neutralisieren kann, das kleine, scharfrandige Plaques in BHK-CT-Zellen bildet, während die Stämme und Klone, die große Plaques bilden, nicht neutralisiert werden, auch nicht nach Zugabe eines 2. Antikörpers (Ziege-anti-Maus-IgG). Diese Aussage gilt aber nicht uneingeschränkt, da die Klone O₁Lausanne 197 (SP) und O₁Lausanne Rd 696 Cl 191 (SP) nicht neutralisiert wurden. Diese beiden Klone unterscheiden sich auch in unseren Tests mit Meerschweinchen-Hyperimmunseren von O₁Lausanne-Lyon Cl 248 und dessen Ausgangsvirus O₁Lyon.

Diese Befunde sind nicht zuletzt deshalb von Interesse, weil vom Rind isoliertes O₁Feldvirus in der Regel in der ersten Passage in Zellkulturen große Plaques bildet und demnach von diesem monoklonalen Antikörper nicht erkannt würde. Der Klon O₁Kaufbeuren Cl 317 SP, abgeleitet von O₁Kaufbeuren 7. BHK, war in BHK-CT-Zellen nicht stabil. Es wurden vielmehr auch nach wiederholten Klonierungen stets einige LP gebildet, die in der klonierten Viruspopulation in diesen Zellen immer wieder entstehen. Dieser "Background" von großen Plaques wurde durch den monoklonalen Antikörper nicht reduziert, auch nicht nach Zugabe eines 2. Antikörpers (Ziege-anti-Maus-IgG).

Der monoklonale Antikörper wies eine geringe Affinität zu den neutralisierten Virusstämmen auf, die dadurch zum Ausdruck kam, daß bei relativ hoher Antikörperkonzentration die Plaquezahl nur geringfügig reduziert wurde. Es war nicht möglich, den Serumtiter bei 90% Plaque-reduktion zu ermitteln. Deshalb wurde die Plaquereduktion bei 50% gemessen. Erst die Zugabe eines 2. Antikörpers ergab eine Plaque-reduktion bei steigender Antikörperkonzentration, die den Reaktionen mit

polyklonalen Meerschweinchen-Hyperimmunseren entsprach (s. Abb. 27). Bei den durch den monoklonalen Antikörper erkannten Stämmen waren trotz der sehr flach verlaufenden Kurven Titerunterschiede zwischen den einzelnen Stämmen zu erkennen (s. Abb. 26); der Stamm O₁BFS 1860 wies einen höheren Titer auf als die anderen untersuchten Stämme. Diese Ergebnisse weisen daraufhin, daß die Neutralisierung einiger O₁-Stämme, bzw. Klone mit dem Plaquemuster korreliert sein kann. Der monoklonale Antikörper eignet sich damit vor allem für die Differenzierung bestimmter Viruspopulationen, wie sie in Zellkulturen durch Mutation und anschließende Selektion entstehen können.



2.3 Die Virusstammdifferenzierung mittels Komplement- bindungsreaktion im Vergleich zum Plaquereduktionstest

Der Vergleich verschiedener O_1 -Stämme wurde in dieser Arbeit überwiegend im Plaquereduktionstest ausgeführt, der eine hohe Reproduzierbarkeit aufweist und nur die Reaktionen der Antikörper mit infektiösem Virus anzeigt. Um die Beziehung zwischen den auf diese Weise erhaltenen Werten und denen aus einem anderen serologischen Test zu ermitteln, wurde eine Gruppe von O_1 -Stämmen mit den jeweiligen Meerschweinchen-Hyperimmunseren auch in der Mikro-KBR geprüft. Die KBR wurde in Form einer 50%igen Hämolyse in einer Modifikation der von Forman (1974a, b) beschriebenen Methode mit gereinigtem Virus durchgeführt (s. 1.2.9.3).

Die mit dieser Methode erhaltenen Ergebnisse sind als Serumtiter, Titer-Differenzen zwischen heterologen und homologen Reaktionen, r-Werte und R-Werte in den Tabellen 22 bis 25 aufgeführt.

Der Vergleich mit dem Plaquereduktionstest ergab für diesen stets höhere Titer. In der Mikro-KBR lagen die Titer im Mittel um $0,84 \log_{10}$ niedriger. Im allgemeinen waren die Werte für die Titerdifferenzen und die r-Werte vergleichbar. Abweichungen ergaben sich in den homologen Serumtitern von O_1 Lyon und O_1 Fyn '83 sowie in den heterologen Reaktionen mit dem Immunserum gegen O_1 Lyon, die aus bisher unbekannten Gründen bis zu $0,24 \log_{10}$ von den erwarteten Werten in den Titerdifferenzen abwichen.

Tab. 22 - Komplementbindungsreaktion (Mikro-KBR):

Titer von Meerschweinchen-Hyperimmunseren in $\log_{10}$

Serum	Virus						
	1. O ₁ Basel	2. O ₁ Kaufbeuren	3. O ₁ BFS 1860	4. O ₁ Laus.-Lyon	5. O ₁ Murchin	6. O ₁ Dänemark	7. O ₁ Fyn
1. O ₁ Basel	3,42	3,22	2,90	2,97	3,40	3,56	3,10
2. O ₁ Kaufbeuren	3,29	3,26	2,95	2,93	3,28	3,18	3,12
3. O ₁ BFS 1860	2,67	2,69	2,88	2,74	2,65	2,60	2,53
4. O ₁ Laus.-Lyon	3,16	3,13	3,17	3,10	3,34	3,28	3,19
5. O ₁ Murchin	3,22	3,19	2,95	2,77	3,19	3,18	2,89
6. O ₁ Dänemark '82	3,24	3,25	2,83	2,77	3,31	3,22	2,87
7. O ₁ Fyn '83	3,04	2,64	2,95	2,87	3,07	2,89	3,21

Tab. 23 - Komplementbindungsreaktion: Differenzen
($-\log_{10}$) zwischen homologen und heterologen Serumtitern

Serum	Virus						
	1. O ₁ Basel	2. O ₁ Kaufbeuren	3. O ₁ BFS 1860	4. O ₁ Laus.-Lyon	5. O ₁ Murchin	6. O ₁ Dänemark	7. O ₁ Fyn
1. O ₁ Basel	0	0,20	0,52	0,45	0,02	-0,14	0,32
4. O ₁ Kaufbeuren	-0,03	0	0,31	0,33	-0,02	0,08	0,14
3. O ₁ BFS 1860	0,21	0,19	0	0,14	0,23	0,28	0,35
2. O ₁ Laus.-Lyon	-0,06	-0,03	-0,07	0	-0,24	-0,18	-0,09
5. O ₁ Murchin	-0,03	0	0,24	0,42	0	0,01	0,30
6. O ₁ Dänemark '82	-0,02	-0,03	0,39	0,45	-0,09	0	0,35
7. O ₁ Fyn '83	0,17	0,57	0,26	0,34	0,14	0,32	0

Tab. 24 - Komplementbindungsreaktion: Relation
zwischen homologen und heterologen Serumtitern, ausgedrückt
als r-Werte

Serum	Virus						
	1. O ₁ Basel	2. O ₁ Kaufbeuren	3. O ₁ BFS 1860	4. O ₁ Laus.-Lyon	5. O ₁ Murchin	6. O ₁ Dänemark	7. O ₁ Fyn
1. O ₁ Basel	1,0	0,63	0,30	0,35	0,95	1,38	0,48
2. O ₁ Kaufbeuren	1,07	1,0	0,49	0,47	1,05	0,83	0,72
3. O ₁ BFS 1860	0,62	0,65	1,0	0,72	0,59	0,52	0,45
4. O ₁ Laus.-Lyon	1,15	1,07	1,17	1,0	1,74	1,51	1,23
5. O ₁ Murchin	1,07	1,0	0,58	0,38	1,0	0,98	0,50
6. O ₁ Dänemark'82	1,05	1,07	0,41	0,35	1,23	1,0	0,45
7. O ₁ Fyn'83	0,68	0,27	0,55	0,46	0,72	0,48	1,0

Tab. 25 - Komplementbindungsreaktion:

Verwandschaftsgrad zwischen Virusstämmen (R-Werte in %)

Serum	Virus						
	1. O ₁ Basel	2. O ₁ Kaufbeuren	3. O ₁ BFS 1860	4. O ₁ Laus.-Lyon	5. O ₁ Murchin	6. O ₁ Dänemark	7. O ₁ Fyn
1. O ₁ Basel	100	82	43	63	101	120	57
4. O ₁ Kaufbeuren		100	56	71	102	94	44
3. O ₁ BFS 1860			100	92	58	46	50
2. O ₁ Laus.-Lyon				100	71	73	75
5. O ₁ Murchin					100	110	60
6. O ₁ Dänemark'82						100	46
7. O ₁ Fyn'83							100

2.4 Die Virusstammdifferenzierung mittels Isoelektrofokussierung

Mit der Entwicklung biochemischer Methoden, wie z.B. der Isoelektrofokussierung (IEF) virusspezifischer Proteine aus Extrakten von infizierten Zellen oder aus gereinigtem Virus, bot sich die Möglichkeit, die serologische Differenzierung von Virusstämmen durch eine weitere Methode zu ergänzen (King et al., 1981; Lombard, 1982). Für die hier untersuchten MKS-Virusstämme des Typs O wurde nachgeprüft, ob Virusisolate mit geringem serologischen Verwandtschaftsgrad deutliche Unterschiede in der Isoelektrofokussierung ihrer viralen Proteine zeigen. Als Beispiel hierfür ist in Abbildung 29 das Bandenmuster der Virusstämme O₁Zusmarshausen, O₁Kaufbeuren, O Wuppertal, O₁Dänemark'82, O₂Brescia, O₁Brent und O₁BFS 1860 wiedergegeben. Unter den gegebenen experimentellen Bedingungen ließen sich in den Gelen die Banden für die Proteine VP2, VPO, VP3 und VP4 identifizieren. VP1 lag nicht in linearen Gradientenbereich. Wie Abbildung 29 zeigt, wies insbesondere der Stamm O Wuppertal in den Proteinen VP2 und VP3 deutliche Abweichungen vom Stamm O₁Kaufbeuren auf, der in den gebräuchlichen Vakzinen enthalten ist. Als Beispiel markanter Unterschiede, wie sie zwischen Stämmen verschiedener Subtypen vorkommen, wurde der Referenzstamm O₂Brescia in den Vergleich mit einbezogen.

Aus den Antigenprofilen ging bereits hervor, daß innerhalb der Gruppe der Virusstämme, die in den Jahren 1965-67 isoliert wurde, geringe serologische Unterschiede bestehen mit Ausnahme der SP-Stämme O₁England und O₁BFS 1860. Der Vergleich der Virusproteine der Stämme O₁Kaufbeuren, O₁Basel, O₁Brent, O₁Burgsteinfurt, O₁Lyon und O₁England in der IEF der Proteine aus gereinigtem Virus ergab für die beiden letztgenannten Stämme einen Unterschied im isoelektrischen Punkt des VP3 (s. Abb. 28). Es ist möglich, daß diese Abweichungen im VP3 mit der unterschiedlichen Plaquebildung (LP; SP) korreliert sind. Ein deutlicher Unterschied in den Virusproteinen VP2 und VP3 zwischen einzelnen O-Isolaten konnte fast ausschließlich bei Stämmen, welche serologisch nicht präzise dem Subtyp O₁ zuzuordnen sind, wie O Israel, O Wuppertal, O Austria und O Finistère, festgestellt werden. Innerhalb des Subtyps O₁ wurden die Schwankungen im isoelektrischen Punkt dieser Proteine meistens nicht gefunden oder sie waren nur geringfügig und ermöglichten somit keine weitere Differenzierung.

Da nicht jeder Austausch einer Aminosäure in der Peptidsequenz eine Änderung des isoelektrischen Punkts des betreffenden Proteins bewirkt, ist die Methode der IEF im Rahmen dieser Arbeit nur als eine Ergänzung der serologischen Tests anzusehen.

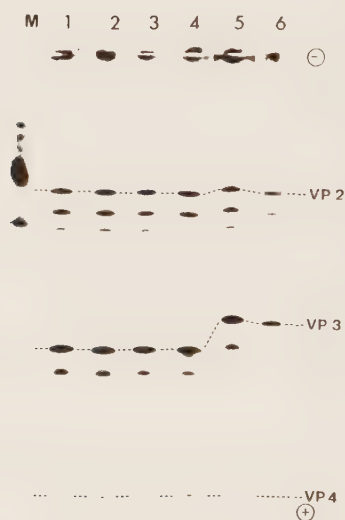


Abb. 28 - Isoelektrofokussierung der Capsidproteine von gereinigtem MKS-Virus; anodischer Lauf.
 1. O₁ Kaufbeuren,
 2. O₁ Basel, 3. O₂ Brent,
 4. O₁ Burgsteinfurt,
 5. O₁ Lyon, 6. O₁ England,
 M. Marker

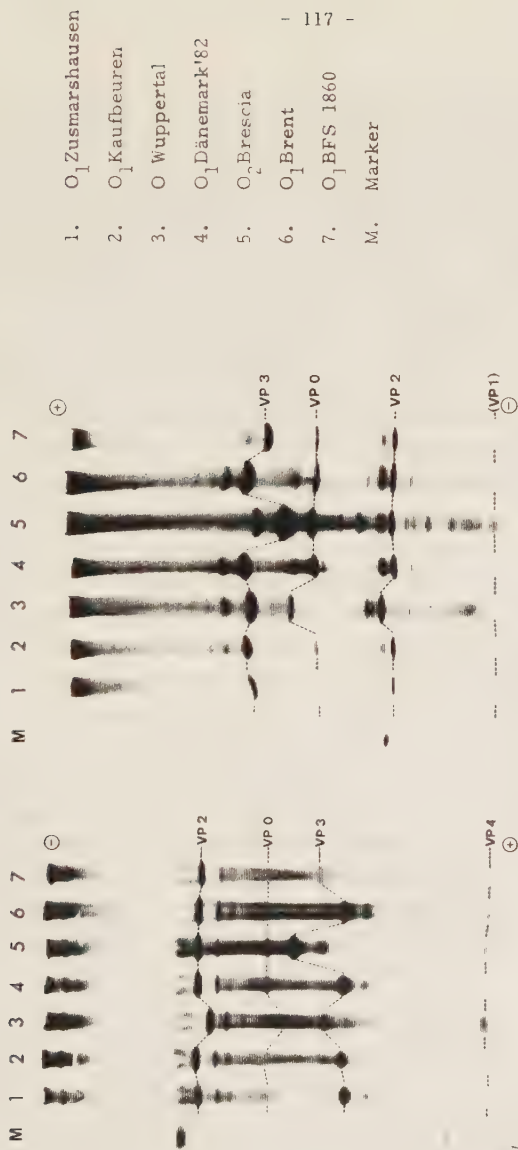


Abb. 29 - Isoelektrofokussierung viruspezifischer Proteine aus MKS-Virus infizierten BHK-21-CT-Zellen;
 a) anodischer Lauf; b) kathodischer Lauf.

D. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Beim Auftreten von MKS in einem Land oder einer Region ist neben der Typendiagnose die Identifizierung des betreffenden Virusstammes, bzw. seine Zuordnung zu einem bestimmten Subtyp die wichtigste Aufgabe. Dieses gilt insbesondere für Länder, in denen die Seuche nicht nur durch Keulung ("stamping out") der betroffenen Tiere, sondern auch durch Vakzination bekämpft wird. Dabei kommt es darauf an, eine Methode anzuwenden, die in kurzer Zeit Ergebnisse liefert und zugleich eine hohe Spezifität in der Unterscheidung von Virusstämmen aufweist. In Bezug auf den Zeitaufwand bis zum Vorliegen der Ergebnisse sind die Komplementbindungsreaktion (KBR) und der enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) an erster Stelle zu nennen (Abu El Zein & Crowther, 1978; Crowther, 1978; Forman, 1974a, b). Eine exakte Differenzierung von Virusisolaten bzw. Zuordnung zu bestimmten Subtypen ist mit diesen Tests aber nur möglich, wenn man gereinigtes oder partiell gereinigtes Antigen einsetzt, so daß unspezifische Antigenkomponenten, wie 12 s-Antigen und VIA-Antigen, nicht an der Reaktion beteiligt sind.

Der Neutralisationstest bietet im Gegensatz dazu den Vorteil, daß eine serologische Charakterisierung auch mit ungereinigtem Virusmaterial durchgeführt werden kann. Als Nachteil ist der höhere Zeitbedarf zu werten. Unter den verschiedenen Möglichkeiten der Durchführung dieses Tests hat sich besonders der Mikro-Neutralisationstest durchgesetzt (Rweyemamu et al., 1978; Suttmöller et al., 1980), der aber, wenn man exakte Ergebnisse erhalten will, zweidimensional mit abgestuften Virus- und Serumverdünnungen durchzuführen ist (Rweyemamu, 1984; Rweyemamu & Hingley, 1984). Der in der vorliegenden Arbeit angewandte Plaquereduktionstest bietet neben der Möglichkeit, mit ungereinigtem Virus arbeiten zu können, den Vorteil, in einem breiten Bereich unabhängig von der Virusdosis zu sein (Capstick et al., 1959; Trautmann & Harris, 1977). Der Test bietet überdies den Vorteil, eine im Vergleich zum Mikro-Neutralisationstest geringere statistische Variabilität aufzuweisen (Lorenz, 1962). Die Verarbeitung einer großen Zahl nahezu identischer Schälchen mit Zellen ist allerdings praktisch nur mit Hilfe der Zellsuspensionstechnik nach Cooper (1961) möglich. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten BHK-21-Zellen der Linie CT erwiesen sich dabei als

besonders geeignet. Sie boten überdies die Möglichkeit, die verschiedenen Virusstämme nach ihrer Plaquemorphologie zu charakterisieren. Mit dieser Technik wurden von einer Serie von MKS-Virusstämmen des Typs O, vorzugsweise des Subtyps O₁, und unter Verwendung der entsprechenden Meerschweinchen-Hyperimmunseren die Daten für die serologische Verwandtschaft dieser Stämme zusammengestellt. Als Form der Darstellung für die serologische Verwandtschaft wurden in den Antigen- bzw. Antikörperprofilen nicht die r-Werte, sondern die Titer-Differenzen in log₁₀ angegeben. In diesen Diagrammen entspricht die Höhe der Säulen dem Grad der Abweichung in den heterologen Reaktionen, und die Konfidenzbereiche sind für positive und negative Abweichungen gleich. Diese Form der Darstellung läßt auch Asymmetrien in der serologischen Verwandtschaft der Virusstämme erkennen.

Die Daten bieten nicht zuletzt wegen der Breite des Ansatzes die Möglichkeit, Virusisolate aus neueren Ausbrüchen binnen weniger Tage mit den geprüften Stämmen zu vergleichen und einzuordnen. Als Beispiel hierfür ist die Charakterisierung des Stammes O₁Zusmarshausen (1984) in die Arbeit einbezogen worden. In diesem Fall wurde gefunden, daß das isolierte Virus eine enge Verwandtschaft sowohl zu den O₁-Isolaten aus dem Seuchenzug 1965-67 als auch zu den 1982 in Dänemark und Mecklenburg isolierten Virusstämmen aufweist. Es ist anzufügen, daß die rasche Identifizierung eines Virusstammes auch eine schnelle Entscheidung darüber erlaubt, ob eine vorhandene Vakzine gegen einen neu isolierten Virusstamm eingesetzt werden kann oder nicht (Rweyemamu et al., 1977; Rweyemamu, 1984).

In diesem Zusammenhang ist zu diskutieren, wie weit Ergebnisse aus serologischen Tests bei der MKS eine Auskunft über die immunologischen Beziehungen verschiedener Virusisolate geben. Allgemein wird davon ausgegangen, daß die Bildung neutralisierender Antikörper die wichtigste Komponente in der Entwicklung der Immunität gegen die MKS ist, obwohl auch zell-vermittelte Immunitätsmechanismen nach einer Infektion mit dem MKS-Virus aktiviert werden (Knudsen et al., 1979; Wardley et al., 1979). Kreuzimmunisierungsversuche an Rindern und Meerschweinchen ergaben, daß die Versuche an Meerschweinchen häufig weniger verläßlich sind als solche an Rindern (Wittmann, 1964; 1966). Rweyemau et al. (1977) sowie

Pay und Parker (1977) kamen aufgrund ihrer Vakzinierungsversuche zu dem Ergebnis, daß eine quantitative Beziehung zwischen der Höhe des Antikörpertiters und der r-Werte einerseits und dem Grad der Immunität andererseits beim Rind besteht. Auch Favre et al. (1981), sowie Fernandez et al. (1981) zeigten, daß neutralisierende Antikörper mit dem Immunitätsstatus bei Rindern in Beziehung stehen. Desgleichen wiesen Suttmöller und Vieira (1980) beim Rind die Abhängigkeit des Immunitätsstatus von der Höhe der Antikörpertiter nach. Sie konnten einen Mindesttiter an Antikörpern für eine belastungsfähige Immunität angeben. Sie wiesen aber auch nach, daß verschiedene Faktoren der Umgebung und Haltungsbedingungen den Grad der Immunität beeinflussen können. Ferner wird die Situation dadurch kompliziert, daß bestimmte Virusstämme eine immunologische Dominanz gegenüber anderen Stämmen desselben Virustyps aufweisen können (Favre et al., 1981). Diese Befunde sind ein Grund dafür, daß auch heute auf immunologische Kreuzversuche beim Auftreten serologisch differierender Stämme nicht verzichtet werden kann, wie z.B. beim Vergleich südamerikanischer und europäischer Virusisolate. Wegen des hohen Aufwandes an Zeit und finanziellen Mitteln sind solche Untersuchungen meistens nur in beschränktem Maße durchführbar.

Bei dem Vergleich der Reaktion einer Auswahl von Meerschweinchen-Hyperimmunseren mit verschiedenen Virusstämmen im Plaquereduktionstest und in der Komplementbindungsreaktion wurde keine vollständige Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen dieser beiden Tests gefunden. Dieses Resultat war unerwartet, da die KBR nur mit gereinigtem Antigen durchgeführt wurde und der Test mit nur $1,5 \text{ C'H}_{50}$ eine relativ hohe Empfindlichkeit aufwies. Eine Erklärung hierfür wurde noch nicht gefunden. Mayr & Wittmann (1962) und Rweyemamu et al. (1977) fanden in ähnlicher Weise abweichende Ergebnisse zwischen KBR und NT, während Pereira (1977) in einem Übersichtsartikel zu dem Schluß kam, daß die verschiedenen serologischen Tests untereinander und in Bezug auf die Kreuzimmunität in vivo eine meist gute Übereinstimmung zeigen.

Von praktischer Bedeutung sind auch die Ergebnisse aus dem Vergleich von Rinder-Immunseren und Meerschweinchen-Hyperimmunseren im Plaquereduktionstest. Diese Untersuchungen zeigen, daß Unterschiede in den Ergebnissen zwischen Tests, welche mit Meerschweinchen-

Hyperimmunseren und solchen, die mit Rinder-Immunseren durchgeführt wurden, bestehen. Allgemein kann man sagen, daß die in unseren Versuchen gewonnenen Meerschweinchen-Hyperimmunseren spezifischer reagierten und mehr serologische Unterschiede anzeigten als die nur Verfügung stehenden Immunseren von Rindern. Hierbei ist aber anzumerken, daß die Meerschweinchen-Hyperimmunseren aus Gruppen von mindestens 4 Tieren gewonnen wurden, während die Rinderseren von einzelnen Tieren stammten. Es ist nicht auszuschließen, daß zwischen Meerschweinchen und Rindern Unterschiede im Erkennen antigener Epitope bestehen, die zu qualitativen Unterschieden zwischen Meerschweinchen-Hyperimmunseren und Rinder-Immunseren führen können. Es bleibt zu prüfen, ob diese Unterschiede zwischen verschiedenen Tierarten unerheblich sind, wenn jeweils nur inaktiviertes, gereinigtes Virus zur Gewinnung von Antiseren eingesetzt wird, wie es unter anderem von Rweyemamu et al. (1984b) empfohlen wurde.

Aus dem serologischen Vergleich der MKS-Virusstämme des Subtyps O₁ geht hervor, daß alle ab 1965 isolierten Virusstämme erheblich vom Referenzstamm O₁Lombardei (1946) abweichen. Der Referenzstamm weist eine enge Verwandtschaft zum MKS-Virusstamm O₁Hannover, jedoch nur einseitig zum Stamm O Finistère auf, während O₁Hannover und O Finistère auch beidseitig fast vollständig übereinstimmen. Diese drei Stämme bilden insofern eine Gruppe. Die Vermutung, daß es sich bei dem Isolat O Spanien (1964) um einen Vorläufer des für den Seuchenzug 1965-67 verantwortlichen O₁Stamm handelt, konnte in den vorliegenden Ergebnissen nicht bestätigt werden. Dieser Stamm weist mit keinem der untersuchten Virusstämme eine nähere Verwandtschaft auf, obwohl sein Antiserum mit vielen Isolaten gut reagiert.

Die aus dem Seuchenzug 1965-67 isolierten Stämme weisen im Plaquereduktionstest einen hohen Verwandtschaftsgrad auf, unabhängig von der Region der betreffenden Virusisolierung (vgl. z.B. O₁Brent, 1965 und O₁Burgsteinfurt, 1966). Interessanterweise reagieren die drei Stämme, die in unserem System kleine Plaques bilden, mit den meisten untersuchten Stämmen sehr gut. Antigen- und Antikörperprofile, die denen von O₁Brent, O₁Kaufbeuren und O₁Burgsteinfurt sehr ähnlich sind, treffen auf die Virusisolate O₁Murchin (1982) und O₁Dänemark (1982) zu. Obwohl die

Herkunft der Ausbrüche in den betreffenden Regionen nicht bekannt ist, ist die Ähnlichkeit mit O₁-Virusstämmen, die zur Vakzineherstellung verwendet werden, auffallend. Auch der 1984 isolierte Stamm O₁Zusmarshausen paßt in diese Gruppe. Die Herkunft des 1983 auf der Insel Fünen isolierten MKS-Virus O₁Fyn ist unbekannt, es weicht jedoch sowohl in der Plaquemorphologie als auch in der serologischen Reaktion von dem 1982 isolierten Stamm O₁Dänemark erheblich ab. O₁Fyn '83 läßt sich insofern keiner Gruppe der untersuchten Virusisolate zuordnen. Untersuchungen von King et al. mit der Methode der Isoelektrofokussierung (Report Pirbright, 1983) führten zu demselben Ergebnis. Es gibt keinen Hinweis aus unseren Versuchen, daß das Isolat O₁Fyn'83 von den Isolaten des Jahres 1982 abstammt.

Für den Stamm O Israel ist keine enge Verwandtschaft mit einem der anderen untersuchten Isolate festzustellen. Interessant ist dabei, daß sich O Israel auch von anderen Isolaten im Nahen Osten unterscheidet (Lombard, 1983).

Der 1981 isolierte MKS-Virusstamm O Austria weist einen hohen Verwandtschaftsgrad mit dem 1982 in der Bundesrepublik isolierten O Wuppertal auf (R = 86%). Diese beiden Stämme bilden eine Gruppe, welche sich deutlich von den anderen in den Vergleich mit einbezogenen Isolaten unterscheidet. Lombard (1983) fand für den Stamm O Wuppertal hohe r-Werte in der KBR mit Seren gegen O Manisa/Türkei (1969) und O Sharquia/Ägypten (1972).

Die Ergebnisse zeigen insgesamt, daß die Klassifizierung von Virusisolaten anhand von Referenzstämmen für die einzelnen Subtypen sehr problematisch ist. Es erscheint sinnvoller, möglichst viele Stämme eines Subtyps mit einem zu klassifizierenden Isolat zu vergleichen und eine Zuordnung zu einer Gruppierung von Virusstämmen anhand der Antigen- bzw. Serumprofile vorzunehmen. Aus der neueren Literatur zu diesem Thema (Arrowsmith & Hedger, 1982; Pereira, 1977) geht hervor, daß das Schema der Einteilung in Subtypen mehr und mehr aufgegeben und ein Isolat nur noch nach dem Jahr der Isolierung und dem Land, der Region, Stadt oder ähnlich bezeichnet wird.

Bei Untersuchungen von MKS-Virusstämmen, für die die Adaptierung des Virus an Zellkulturen erforderlich ist, ist die Möglichkeit der Selektion und damit einer Abweichung vom Ausgangsvirus in verschiedenen Eigenschaften zu beachten (Cowan et al., 1978; Parry et al., 1978; Sobrino et al., 1983). In der vorliegenden Arbeit wurde daher auch untersucht, ob Virusstämme unterschiedlicher Herkunft, aber gleicher Bezeichnung im serologischen Test noch übereinstimmen. Außerdem wurde geprüft, in welchem Maße anhand der Plaque-morphologie unterscheidbare Klone aus einer Viruspopulation Abweichungen in ihrer Antigenität aufweisen können. Für diese Untersuchungen wurden unter der Bezeichnung O₁Lausanne laufende Virusstämme gewählt, von denen drei Ausgangsstämme verschiedener Herkunft zur Verfügung standen (O₁Lyon, O₁Lausanne Rd 696, O₁Lausanne '65). Die daraus isolierten Klone wurden in einer Passage in BHK-21-CT-Zellen vermehrt und im Plaquereduktionstest verglichen. Die Methode der Auswahl von Plaques mit unterschiedlicher Morphologie erwies sich als vorteilhaft, da sie gleichzeitig die Prüfung der Viruspopulation auf Einheitlichkeit anhand des Plaquebildes ermöglichte.

Die Abweichungen einzelner Klone von der serologischen Spezifität des Ausgangsvirus oder im Vergleich der Klone untereinander waren zum Teil erheblich und erreichten bei einem Klon eine Titer-Differenz von ca. $1,0 \log_{10}$, was einem r-Wert von 0,1 entspricht. Ein solcher Wert würde nach dem von Brooksby (1968) aufgestelltem Schema der Zuordnung zu verschiedenen Subtypen entsprechen. Dabei ist zu betonen, daß die Klone nicht nur aus Passagen in Zell-Kulturen isoliert wurden, sondern zu einem großen Teil (Cl 240, 248, 249, 191) aus Aphthenmaterial nach einer Passage im Rind. Diese Befunde bestätigen Berichte in der Literatur, daß heterogene Viruspopulationen nicht nur in Zellkulturen (Cowan et al., 1978) sondern auch im natürlichen Wirt ohne erkennbaren Selektionsdruck gebildet werden (Rowlands et al., 1983). Es ließ sich aber keine Voraussage darüber machen, in welchem Maß eine Plaquemutante in der Antigenität vom Ausgangsvirus abweichen würde. Eine mögliche Korrelation zwischen Plaquetyp und serologischer Spezifität ergab sich interessanterweise aus den Ergebnissen von Plaquereduktionstests mit den meisten vorhandenen Virusstämmen und einem monoklonalen Antikörper gegen den Virusstamm O₁Kaufbeuren.

Dabei wurde festgestellt, daß dieser monoklonale Antikörper nur Virusstämme eines bestimmten Plaquetyps (SP) neutralisieren kann. Der Plaquetyp der neutralisierten Virusstämme entspricht dem Plaquetyp des Virusstammes, der für die Induktion der Antikörper in der Maus verwendet wurde.

Die Kenntnisse der Struktur des MKS-Virus, die mit biochemischen, molekularbiologischen und biophysikalischen Methoden erarbeitet wurden, können bislang nur beschränkt zur Differenzierung von Subtypen oder Virusstämmen herangezogen werden. Von den zur Verfügung stehenden Methoden werden zur Zeit vor allem die Polyacrylamidgelelektrophorese, die Isoelektrofokussierung und die zweidimensionale Gelelektrophorese von RNA-Bruchstücken für die Differenzierung von Virusisolaten eingesetzt (Brown & Underwood, 1982; King et al., 1981; La Torre et al., 1982, 1984). Andere Methoden, wie z.B. die Analyse virusspezifischer Proteine (Robson et al., 1979, 1980), sind arbeitsaufwendig und erfordern entsprechende Laboreinrichtungen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Isoelektrofokussierung der virusspezifischen Proteine als ergänzende Methode im Vergleich von Virusstämmen angewandt. Dabei ergab sich, daß Virusstämme, die zu einer Gruppe gehören, in der Regel identische oder sehr ähnliche Bandenmuster haben, während Stämme mit geringerem Verwandtschaftsgrad im serologischen Test relativ häufig Unterschiede im isoelektrischen Punkt der Virusproteine VP2 (und somit auch VP0) und VP3 aufweisen. Dies weist darauf hin, daß neben dem VP1 auch die Strukturproteine VP2 und VP3 variable Bereiche aufweisen, was durch Sequenzuntersuchungen bestätigt wird (Beck, 1983b).

Mit den Methoden der Gentechnologie ist es möglich geworden, die gesamte Struktur des Genoms des MKS-Virus und verwandter Picornaviren aufzuklären und daraus die Aminosäuresequenz der virusspezifischen Proteine abzuleiten (Beck et al., 1983a, b; Carroll et al., 1984; Kleid et al., 1981; Makoff et al., 1982). Diese Untersuchungen liefern die molekulare Basis für die antigene Variabilität des MKS-Virus und bieten eine Möglichkeit, die antigenen Epitope auf den Capsidproteinen des Virus zu lokalisieren (Baxt et al., 1984; Haresnape & McCahon, 1983; Hopp & Woods, 1981; Pfaff et al., 1982;

Robertson et al., 1983, 1984). Es ist zu erwarten, daß die Ergebnisse, die mit molekularbiologischen und ergänzenden biochemischen Methoden erarbeitet werden, sowohl in der Diagnostik als auch in der Entwicklung und Produktion von Impfstoffen die mit den bislang angewandten serologischen Methoden erhaltenen Resultate in wertvoller Weise ergänzen werden.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Unter Einbeziehung der Virusisolate aus den letzten Jahren wurde eine Reihe von Maul- und Klauenseuche (MKS)-Virusstämmen des Serotyps O, insbesondere des Subtyps O₁, charakterisiert und verglichen. Zu diesem Zweck wurde der Kreuzneutralisationstest in Form eines Plaquereduktionstests als Referenzmethode gewählt. Diese Methode bot zugleich die Möglichkeit, die Virusisolate nach der Plaquemorphologie in "large plaque" (LP)- und "small plaque" (SP)-Stämme einzuteilen. Die Ergebnisse der Plaquereduktionstests wurden in Antigenprofilen der einzelnen Virusstämme, erstellt mit Hilfe der Titer-Differenzen, zusammengefaßt. Es konnten Gruppierungen innerhalb desselben Subtyps festgestellt werden. Die frühen MKS-Isolate O₁Lombardei, O₁Hannover und in geringerem Maße auch O Finistère bilden eine Gruppe, die sich von den Isolaten aus dem Seuchenzug der Jahre 1965-67 unterscheidet. In diese Gruppe, zu der die Stämme O₁Brent, O₁Basel, O₁Kaufbeuren, O₁Burgsteinfurt, O₁England, O₁BFS 1860 und O₁Lausanne (Lyon) gehören, konnten auch die Isolate O₁Murchin (1982), O₁Dänemark (1982) und O₁Zusmarshausen (1984) eingestuft werden. O Austria (1981) und O Wuppertal (1982) sind eng verwandt, unterscheiden sich jedoch von den anderen untersuchten Virusstämmen. O Spanien (1964), O₁Fyn (1983) und O Israel (1981) ließen sich keiner der genannten Gruppen zuordnen.

Zur weiteren Identifizierung anhand der Serologie wurde die Kreuzreaktion der untersuchten Virusstämme und Meerschweinchen-Hyperimmunseren in der Mikro-Komplementbindungsreaktion in einer Modifikation der von Forman angegebene Methode geprüft. Es wurde keine vollständige Übereinstimmung der Ergebnisse von Plaquereduktionstest und Komplementbindungsreaktion gefunden. Im Plaquereduktionstest konnte ein Unterschied in der Reaktion von MKS-Virusstämmen mit Meerschweinchen-Hyperimmunseren und Rinder-Immunseren festgestellt werden.

Um zu prüfen, ob durch Passagen im Rind oder in Zellkulturen bedingte Abweichungen im Plaquebild auch in der Serologie zum Ausdruck kommen, wurden verschiedene LP- und SP-Klone des Virusstammes

O₁Lausanne und deren Antiseren im Plaquereduktionstest verglichen. Es wurden Klone isoliert, die sich in der serologischen Spezifität erheblich vom Ausgangsvirus unterscheiden. In Versuchen mit einem monoklonalen Antikörper gegen den Virusstamm O₁Kaufbeuren wurde ebenfalls festgestellt, daß die serologische Spezifität mit dem Plaquetyp korreliert sein kann.

In der Isoelektrofokussierung der virusspezifischen Proteine von MKS-Virusstämmen konnte unter den gegebenen experimentellen Bedingungen das Bandenmuster der Virusproteine VP2, VP3 und VP4 analysiert werden. Es wurde gefunden, daß innerhalb eines Subtyps Unterschiede im isoelektrischen Punkt von VP2 und VP3 auftreten, die zur Charakterisierung eines Virusstammes beitragen können.

SUMMARY

Characterization of recent type O-isolates of foot-and-mouth disease virus

A variety of foot-and-mouth disease (FMD) virus strains, mainly of serotype O₁ and including recent type O isolates in Europe was characterized serologically. The cross neutralization test performed as a plaque reduction assay was the method of choice. By this method virus isolates could also be classified according to plaque morphology as large plaque (LP) and small plaque (SP) forming strains. The results of cross-plaque reduction assays with different immune sera were compiled as antigen profiles for the particular virus strains. Based on antigenic relationship the virus strains tested could be arranged in different groups. Early isolates comprising O₁Lombardy (1946), O₁Hannover (1960) and to a lesser extent also O Finistère (1957) form one group different from the strains isolated at the past epizootic in 1965 to 1967. This group includes virus strains O₁Brent, O₁Basel, O₁Kaufbeuren, O₁Burgsteinfurt, O₁BFS 1860 and O₁Lausanne (Lyon). Three recent isolates, O₁Denmark (1982), O₁Murchin (1982) and O₁Zusmarshausen (1984) are closely related serologically to the preceding group. Two isolates, O Austria (1981) and O Wuppertal (1982) form a group distinct from all other strains tested. O Spain (1964), O Israel (1981) and O₁Fyn (Denmark, 1983) could not be assigned to any group.

For further serological characterization cross complement fixation tests (micro method) were carried out with purified 146 s antigen and guinea pig hyperimmune sera. These tests confirmed the results obtained from plaque reduction assays although some deviations were noted. Likewise, some differences were found in comparative plaque reduction tests done in parallel with guinea pig and cattle immune sera.

To examine if virus passage in cattle or cell cultures resulting in differing plaque morphology were accompanied by changes in serologic specificity a variety of plaques from virus strains named O₁Lausanne was cloned and tested with the respective antisera in plaque reduction assays. Remarkable serological differences were found among clones and the respective parental strains. A series of experiments with a

monoclonal antibody to strain O₁Kaufbeuren also confirmed that a change in plaque morphology may be correlated with a change in serological specificity.

Comparative isoelectrofocussing of viral proteins from different virus strains revealed that even within subtype O₁ differences in the position of VP2 and VP3 can be found which can be used as an additional marker for the identification of virus isolates.

RESUMO

Caracterização de amostras recentes do vírus da febre aftosa

Foram comparadas e classificadas amostras do vírus da febre aftosa do tipo O, em sua maioria pertencentes ao sub-tipo O₁, incluindo cepas isoladas na Europa nos últimos anos. Como método de referencia foi escolhida a neutralização cruzada, realizada através do teste de redução de placas. Este permitiu também a classificação dos antígenos de acordo com a dimensão das placas formadas, em cepas "small plaque" (SP) e "large plaque" (LP). Os resultados dos testes de redução de placas foram resumidos em perfis antigênicos, baseados na diferença entre os títulos de reações homólogas e heterólogas. Foi possível demarcar grupos dentro de um sub-tipo.

As cepas mais antigas, O₁Lombardia, O₁Hannover e, em menor proporção, O Finistère, formam um grupo que se diferencia das cepas isoladas durante a epizootia dos anos 1965-67. A este grupo, ao qual pertencem as cepas O₁Brent, O₁Basiléia, O₁Kaufbeuren, O₁Burgsteinfurt, O₁Inglaterra, O₁BFS 1860 e O₁Lausanne (Lyon), assemelham-se os isolados O₁Murchin (1982), O₁Dinamarca (1982) e O₁Zusmarshausen (1984). O Austria (1981) e O Wuppertal (1982) possuem um parentesco elevado, porém diferem dos outros antígenos examinados. O Espanha (1964), O₁Fyn (Dinamarca, 1983) e O Israel (1981) não se enquadram em nenhum dos grupos citados. Seguindo, na identificação de isolados do vírus da febre aftosa, foi efetuada a prova de fixação de complemento em microplacas. Os resultados obtidos através do teste de redução de placas em geral equivalem aos da prova de fixação de complemento podendo ocorrer, porém alguma variação. Além disso, foi possível verificar uma leve divergência entre testes de redução de placas realizados com soros de cobaias hiperimunes e soros de bovinos imunes.

Para esclarecer, se variações na conformação das placas são acompanhadas de alterações serológicas, foram examinados clones do tipo LP e SP da cepa O₁Lausanne e seus respectivos antisoros específicos através do teste de redução de placas. De experimentos com anticorpos

monoclonais contra o vírus O₁Kaufbeuren resultou, que especificidades serológicas podem estar correlacionadas ao tipo de placa formada.

No isoeletroenfoque das proteínas virais específicas (VP) de cepas do vírus da febra aftosa, foi possível examinar, nas dadas condições experimentais, as proteínas virais VP2, VP3 e VP4. Foi verificado que podem ocorrer alterações no ponto isoeletrico da VP2 e VP3 dentro de um mesmo sub-tipo, fato este que pode contribuir para a caracterização de uma cepa.

F. LITERATURVERZEICHNIS

- ABU EL ZEIN, E.M.E. und J.R. CROWTHER, 1978: Enzyme-labelled immunosorbent assay techniques in foot-and-mouth disease virus research.
J.Hyg., Camb. 80, 391-399.
- AHL, R., 1967: Genommaskierung beim Maul- und Klauenseuchevirus und das Verhalten von genommaskiertem Virus bei der Thermo-inaktivierung.
Arch.ges.Virusforsch. 21, 217-233.
- AHL, R., 1974: Inhibitors of foot-and-mouth disease virus. I. Effect of EDTA, temperature and interferon on the viral growth cycle.
Arch.ges.Virusforsch. 46, 302-314.
- ANDERSON, E.C., J. ANDERSON und W.J. DOUGHTY, 1974: The foot-and-mouth disease virus subtype variants in Kenya.
J.Hyg., Camb. 73, 237-244.
- Animal Health Yearbook. FAO-WHO-OIE, 1974-1983.
- The Animal Virus Research Institute Report 1983, 8-15, Pirbright 1984
- ARCHETTI, J. und F.L. HORSFALL, 1950: Persistent antigenic variation of influenza A viruses after incomplete neutralization in ovo with heterologous immune serum. J.exp.Med. 92, 441-462.
- ARLINGHAUS, R.B. und J. POLATNICK, 1968: Foot-and-mouth disease virus induced ribonucleic acid polymerase in baby hamster kidney cells.
Virology 31, 601-608.
- ARROWSMITH, A.E.M., 1975: Variation among strains of type A foot-and-mouth disease virus in the eastern mediterranean region.
J.Hyg., Camb. 75, 387-397.
- ARROWSMITH, A.E.M., 1982: Strains of foot-and-mouth disease virus types O, A, and Asia 1 in the Middle East and north Africa. Session of the Research Group of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease, Pirbright, 22-24 Sept. 1982, 19-20, Hrsg. FAO, Rom, 1983.
- ARROWSMITH, A.E.M. und R.S. HEDGER, 1982: Serological comparisons of FMD type O: Strains from Europe and the Middle East, 1981-1982.

- Proceedings of the 16th Conference of the International Office of Epizootics, Paris, 14-17 Sept. 1982, 563-570, Hrsg. OIE, Paris.
- BACHRACH, H.L., 1968: Foot-and-mouth disease.
Ann.Rev.Microbiol. 22, 201-244.
- BACHRACH, H.L. und S.S. BREESE, Jr., 1958: Purification and electron microscopy of foot-and-mouth disease virus.
Proc.Soc.exptl. Biol.Med. 97, 659-665.
- BACHRACH, H.L., R. TRAUTWEIN, S.S. BREESE, Jr. 1964: Chemical and physical properties of virtually pure foot-and-mouth disease virus.
Am.J.Vet.Res. 25, 333-342.
- BACHRACH, H.L., D.M. MOORE, P.D. McKERCHER und J. POLATNICK, 1975: Immune and antibody responses to an isolated capsid protein of foot-and-mouth disease virus.
J.Immunol. 115, 1636-1641.
- BACHRACH, H.L., D.M. MOORE, P.D. McKERCHER und J. POLATNICK, 1976: An experimental subunit vaccine for foot-and-mouth disease.
Develop.biol.Standard. 35, 155-160.
- BAHNEMANN, H.G., 1975: Binary ethylenimine as an inactivant for foot-and-mouth disease virus and its application for vaccine production.
Arch.Virol. 47, 47-56.
- BAXT, B., D.O. MORGAN, B.H. ROBERTSON, und C.A. TIMPONE, 1984: Epitopes on foot-and-mouth disease virus outer capsid protein VP1 involved in neutralization and cell attachment.
J.Virol. 51, 298-305.
- BECK, E., G. FEIL, K. STROHMAIER, 1983a: The molecular basis of antigenic variation of foot-and-mouth disease virus.
EMBO Journal 2, 555-559.
- BECK, E., S. FORSS, K. STREBEL, R. CATTANEO und G. FEIL, 1983b: Structure of the FMDV translation initiation site and of the structural proteins.
Nucleic Acids Res. 11, 7873-7885.
- BEDSON, S.P., H.B. MAITLAND und Y.M. BURBURY, 1927: Further observations on foot-and-mouth disease. Section A. - Experimental studies of immunity in guinea-pigs to foot-and-mouth disease.
J.comp.Pathol. 40, 5.

- VAN BEKKUM, J.G., H.S. FRENKEL, H.H.J. FREDERIKS, S.
FRENKEL, 1959: Observation on the carrier state of cattle respond to foot-and-mouth disease virus.
Tijdschr. Diergeneesk. 84, 1159.
- BITTLE, J.L., R.A. HOUGHTEN, H. ALEXANDER, T.M. SHINNICK, J.G. SUTCLIFFE, R.A. LERNER, D.J. ROWLANDS und F. BROWN, 1982: Protection against foot-and-mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence.
Nature 298, 30-33.
- BITTLE, J.L., P. WORRELL, R.A. HOUGHTEN, R.A. LERNER, D.J. ROWLANDS und F. BROWN, 1984: Immunization against foot-and-mouth disease with a chemically synthesized peptide.
In: Modern approaches to vaccines: Molecular and chemical basis of virus virulence and immunogenicity. Hrsg. Robert M. Chanock and Richard A. Lerner, Cold Spring Harbor Laboratory.
- BLACK, L., M.M. RWEYEMAMU und A. BOGE, 1984: Revaccination response of cattle as a function of the 140 s foot-and-mouth disease antigen dose.
J.comp.Path. 94, 417-424.
- BOOTH, J.C., 1977: Enhancement by diethylaminoethyl-dextran of the plaque forming activity of foot-and-mouth disease virus antibody complexes in pig kidney IB-RS-2 cells.
Arch.Virol. 55, 251-261.
- BRADISH, C.J., M.W. HENDERSON und J.B. KIRHAM, 1960: Concentration and electron microscopy of the characteristic particle of foot-and-mouth disease virus.
J.gen.Microbiol. 22, 371-391.
- BROOKSBY, J.B., 1952: The technique of complement fixation in foot-and-mouth disease research.
Agric.Res.Council, London, Special Report Series (12).
- BROOKSBY, J.B. und J. ROGERS, 1957: Methods used in typing the virus of foot-and-mouth disease at Pirbright, 1950-55.
In: Methods of typing and cultivation of foot-and-mouth disease viruses, OEEC, Paris.
- BROOKSBY, J.B., 1968: Variants and immunity in foot-and-mouth disease. Variants and immunity: Definition for serological investigation.

- International Symposium on Foot-and-Mouth Disease: Variants and Immunity, Lyon 1967; Series Immunobiol.Standard, 8, 1-10.
- BROOKSBY, J.B., 1981: Tracing outbreaks of foot-and-mouth disease. *Nature*, 293, 431-432.
- BROOKSBY, J.B., 1982: Portraits of viruses: Foot-and-mouth disease virus. *Intervirology* 18, 1-23.
- BROWN, F. und C.J. SMALL, 1970: Demonstration of three specific sites on the surface of foot-and-mouth disease virus by antibody complexing. *J.gen.Virol.* 7, 115-127.
- BROWN, F. und B.O. UNDERWOOD, 1982: Identification of FMD virus isolates by ribonuclease T1 fingerprinting of their RNA. Proceedings of the 16th Conference of the International Office of Epizootics, Paris, 14-17 Sept. 1982, 255-262, Hrsg. OIE, Paris.
- BURROWS, R., J.A. MANN, A. GREIG, W.G. CHAPMAN und D. GOODRIDGE; 1971: The growth and persistence of foot-and-mouth disease virus in bovine mammary gland. *J.Hyg., Camb.* 69, 307-321.
- CALLIS, J.J., 1979: Foot-and-mouth disease - a world problem. Proceedings of the 83rd Annual Meeting of the United States Animal Health Association, San Diego, California.
- CAPSTICK, P.B., R.F. SELLERS und D.L. STEWART, 1959: The neutralization of the virus of foot-and-mouth disease by immune serum. *Arch.ges.Virusforsch.* 9, 606-620.
- CARROLL, A.R., D.J. ROWLANDS und B.E. CLARKE, 1984: The complete nucleotide sequence of the RNA coding for the primary translation product of foot-and-mouth disease virus. *Nucleic Acids Res.* 12, 2461-2472.
- CARTON, P. und R. VITTOZ, 1957: Role des facteurs climatiques sur l'évolution des epizooties. *Bull.Off.int.Epiz.* 48, 533-566.
- CARTWRIGHT, B., D.J. MORRELL und F. BROWN, 1982: Nature of antibody response to the foot-and-mouth disease virus particle, its 12 s protein subunit and the isolated immunizing polypeptide VP1. *J.gen.Virol.* 63, 375-381.

- DE CASTRO, M.P., 1964: Comportamento de virus aftoso em cultura de células susceptíveis da linhagem de células suínas IB-RS-2. *Arq.Inst.Biol.* (Sao Paulo) 31, 63-78.
- CLEVELAND, D.W., S.G. FISCHER, M.W. KIRSCHNER und U.K. LAEMMLI, 1977: Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. *J.biol.Chem.* 252, 1102-1106.
- COOPER, P.D., 1961: An improved agar cell-suspension plaque assay for poliovirus: some factors affecting efficiency of plating. *Virology* 13, 153-157.
- COOPER, P.D., V.I. AGOL, H.L. BACHRACH, F. BROWN, Y. GHENDON, A.J. GIBBS, J.H. GILLESPIE, K. LONBERG-HOLM, B. MANDEL, J.L. MELNICK, S.B. MOHANTY, R.C. POVEY, R.R. RUECKERT, F.L. SCHAFFER und D.A.J. TYRRELL, 1978: Picornaviridae: Second Report. *Intervirology* 10, 165-180.
- COSTA GIOMI, M.P., L. DURINI, I. BERGMANN, O. MAZZUCA, M.E. AUED DE RAU, G. FERNANDEZ, J.M.Y. PARISI und J.L. LA TORRE, 1982: Estudios antigenicos e bioquimicos combinados de cepas prototipo y de campo de los virus de la fiebre aftosa en la Republica Argentina. *Proceedings of the 16th Conference of the International Office of Epizootics, Paris, 14-17 Sept. 1982, 273-290, Hrsg. OIE, Paris.*
- COWAN, K.M., 1969: Immunochemical studies of foot-and-mouth disease. V. Antigenic variants of virus demonstrated by immunodiffusion analysis with 19 s but not 7 s antibodies. *J.exp.Med.* 129, 333-350.
- COWAN, K.M., N. EROL und A.P. WHITELAND, 1978: Effect of trypsin treatment on the antigenic characteristics of plaque variants of type O₁ and type Asia 1 foot-and-mouth disease viruses. *J.gen.Virol.* 41, 437-442.
- CROWTHER, J.R., 1978: Subtyping of FMD virus-new approaches. *Proceedings of the 15th Conference of the O.I.E. Permanent Comission of Foot-and-Mouth Disease, Paris, 10-14 October 1978.*
- DOEL, T.R., D.V. SANGAR, D.J. ROWLANDS und F. BROWN, 1978: A

- reappraisal of the biochemical map of foot-and-mouth disease virus RNA.
J.gen.Virol. 41, 395-404.
- DOEL, T.R. und P.J. BACCARINI, 1981: Thermal stability of foot-and-mouth disease virus.
Arch.Virol. 70, 21-32.
- DOEL, T.R. und T. COLLEN, 1983: The detection and inhibition of proteolytic enzyme activity in concentrated preparations of inactivated foot-and-mouth disease virus.
J.biol.Standard. 11, 35-46.
- DONALDSON, A.I., J. GLOSTER, L.D.J. HARVEY und D.H. DEANS, 1982: Use of prediction models to forecast and analyse airborne spread during the foot-and-mouth disease outbreak in Brittany, Jersey and the Isle of Wight in 1981.
Vet.Rec. 10, 53-57.
- FAVRE, H., M. LOMBARD, J. JUVE und G. LOPEZ, 1981: Etudes sérologique et immunologique des souches vaccinales A₅Allier France 1960 et A₂₄Argentine 1968.
Session of the Research Group of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease, Tübingen, 29 Sept.-1.Oct. 1981, 58-61, Hrsg. FAO, Rom, 1982.
- FECHNER, J., 1964: Schutzimpfungen bei Haustieren.
Leipzig, S. Hirzel, 1964.
- FERNANDEZ, A.A., Y.L. VIANNA FILHO, L.A.E. DURINI und P. SUTMÜLLER, 1981: Information on south american FMD strains of type O and A.
Session of the Research Group of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease, Tübingen, 29.Sept.-1.Oct. 1981, 62-63, Hrsg. FAO, Rom, 1982.
- FORMAN, A.J., 1974a: A study of foot-and-mouth disease virus strains by complement fixation. I. A model for the fixation of complement by antigen/antibody mixtures.
J.Hyg., Camb. 72, 397-405.
- FORMAN, A.J., 1974b: A study of foot-and-mouth disease virus strains by complement fixation. II. A comparison of tube and microplate tests for the differentiation of strains.
J.Hyg., Camb. 72, 407-413.

- FORMAN, A.J., 1975: A comparison of some immunological methods for the differentiation of strains of foot-and-mouth disease virus. *J.Hyg., Camb.* 74, 215-225.
- FRENKEL, H.S., 1947: La culture du virus de la fièvre aphteuse sur l'épithélium de la langue des bovidés. *Bull.Off.intern.Epiz.* 28, 155-162.
- FRISBY, D., C. NEWTON, N.H. CAREY, P. FELLNER, J.F.E. NEWMANN, T.J.R. HARRIS und F. BROWN, 1976: Oligonucleotide mapping of picornavirus RNAs by two-dimensional electrophoresis. *Virology* 71, 379-388.
- GLUCKOV, B.A., 1964: Die Antikörpertiterbewegung bei neugeborenen Kälbern. *Veterinarija* 41, 20.
- GRAF, H., 1922: Über die Behandlung der Maul- und Klauenseuche. *Schweiz.Arch.Tierheilkd.* 81, 525.
- GRAVES, J.H., K.M. COWAN und R. TRAUTWEIN, 1964: Characterization of antibodies produced by guinea pigs inoculated with inactivated foot-and-mouth disease antigen. *J.Immunol.* 92, 501-506.
- GRAVES, J.H., K.M. COWAN und R. TRAUTMAN, 1968: Immunochemical studies of foot-and-mouth disease. II. Characterization of RNA-free viruslike particles. *Virology* 34, 269-274.
- GRUBMAN, M.J., 1980: The 5'end of foot-and-mouth disease virion RNA contains a protein covalently linked to the nucleotide pUp. *Arch.Virol.* 63, 311-315.
- HARDY, M.M. und D.M. MOORE, 1981: Neutralization of foot-and-mouth disease virus. I. Sensitization of the 140 s virion by antibody also reactive with the 12 s protein subunit. *J.gen.Virol.* 55, 415-427.
- HARENAPE, J.M. und D. McCAHON, 1983: Four independent antigenic determinants on the capsid polypeptides of aphthovirus. *J.gen.Virol.* 64, 2345-2355.
- HECKE, F. und R. LORENZ, 1960: Bedingungen und Grenzen statistisch gesicherter Aussagen bei der Immunitätsprüfung von Maul- und Klauenseuche Vakzinen mittels Tuchinfektion. *Mh.Tierheilkd.* 12, 199-209,

- HEDLER, P., 1922: Beitrag zur Frage der intrauterinen Übertragung der Immunität bei Maul- und Klauenseuche.
Inaug.Diss.München, Ref.Zbl.Bakt.I.Ref. 74, 251.
- HOFSCHNEIDER, P.H., E. BURGELT, M. KAUZMANN, M. MUSSGAY, R. FRANZE, R. AHL, H. BOHM, K. STROHMAIER, H. KUPPER und B. OTTO, 1981: Studies on the antigenicity and immunogenicity of the foot-and-mouth disease viral protein VP1 expressed in E. coli.
Prospective biological products for viral diseases. 6th Munich Symposium on Microbiology. Hrsg. P.A. Bachmann, Verlag Taylor and Francis, London 1981.
- HOPP, T.P. und K.R. WOODS, 1981: Predication of protein antigenic determinants from amino acid sequences.
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 78, 3824-3828.
- HUGH-JONES, M.E., 1972: Epidemiological studies on the 1967/68 foot-and-mouth disease virus propagated in cell cultures containing antiviral sera.
J.gen.Microbiol. 41, 135-142.
- HYDE, L. und J.H. GRAVES, 1963: The comparative titration of foot-and-mouth disease virus inoculated into the tongue and foot pads of guinea pigs.
Am.J.Vet.Res. 24, 642-643.
- HYSLOP, N.St.G., 1970: The epizootiology and epidemiology of foot-and-mouth disease.
Advances in Vet.Sc. and Comp.Med. 14, 261-307.
- KÄRBER, G., 1931: Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche.
Arch.exp.Path.Pharmakol. 162, 480-483.
- KING, A.M.Q. und J.W.I. NEWMAN, 1980: Temperature-sensitive mutants of foot-and-mouth disease virus with altered structural polypeptides. A. Identification by electrofocusing.
J.Virol. 34, 59-66.
- KING, A.M.Q., W.R. SLADE, J.W.I. NEWMAN und D. McCAHON, 1980: Temperature-sensitive mutants of foot-and-mouth disease virus with altered structural polypeptides. II. Comparison of recombination and biochemical maps.
J.Virol. 34, 67-72.

- KING, A.M.Q., B.O. UNDERWOOD, D. McCAHON, J.W.I und NEWMAN, F. BROWN, 1981: Biochemical identification of viruses causing the 1981 outbreaks of foot-and-mouth disease in the U.K.
Nature 293, 479-480.
- KLEID, D.G., D. YANSURA, B. SMALL, D. DOWBENKO, D.M. MOORE, M.J. GRUBMAN, P.D. McKERCHER, D.O. MORGAN, B.H. ROBERTSON und H.L. BACHRACH, 1981: Cloned viral protein vaccine for foot-and-mouth disease: Response in cattle and swine.
Science 214, 1125-1129.
- KNUDSEN, R.C., C.M. GROOCCOCK und A.A. ANDERSON, 1979:
Immunity to foot-and-mouth disease virus in guinea pigs: clinical and immune response.
Infect.Immun. 24, 787-792.
- KNUDSEN, R.C., C.M. GROOCCOCK und A.A. ANDERSON, 1982:
Difference in protective immunity of the tongue and feet of guinea pigs vaccinated with foot-and-mouth disease virus type A₁₂ following intradermolingual and footpad challenge.
Vet.Microbiol. 7, 97-107.
- KNUDSEN, R.C., C.M. GROOCCOCK und A.A. ANDERSON, 1983:
Protective role of foot-and-mouth disease virus antibody in vitro and in vivo in guinea-pigs.
J.gen.Virol. 64, 341-348.
- KUPPER, H., W. KELLER, C. KURZ, S. FORSS, H. SCHALLER, R. FRANZE, K. STROHMAIER, O. MARQUARDT, V.G. ZASLAVSKY und P.H. HOFSCHEIDER, 1981: Cloning of cDNA of major antigen of FMDV and expression in *E. coli*.
Nature 289, 555-559.
- KURZ, C., S. FORSS, H. KUPPER, K. STROHMAIER und H. SCHALLER, 1981: Nucleotide sequence and corresponding amino acid sequence of the gene for the major antigen of foot-and-mouth disease virus.
Nucleic Acids Res. 9, 1919-1931.
- LA TORRE, J.L., B.O. UNDERWOOD, M. LEBENDIKER, B.M. GORMAN und F. BROWN, 1982: Application of RNase T1 one- and two-dimensional analysis to the rapid identification of foot-and-mouth disease virus.
Infect.Immun. 36, 142-147.

- LA TORRE, J.L., J.M. PARISI, S.G. TISMINETKY und A. DE PETRIS, 1984: Description générale des techniques biochimiques permettant d'identifier les virus animaux et d'établir leurs caractéristiques. Rev.Sci.tech.Off.int.Epiz. 3, 271-289.
- LAPORTE, J., J. GROSCLAUDE, J. WANTYGHAM, S. BERNHARD und B. ROUZE, 1973: Neutralisation en culture cellulaire du pouvoir infectieux du virus de la fièvre aphteuse par des sérums provenant de porcs immunisés à l'aide d'une protéine virale purifiée. Compt.rend.hebd.acad.sci. D 276, 3399-3401.
- LOMBARD, M., 1981: Comparative study of two FMDV strains which appeared in march and april 1981 - O Austria and O Israel. Session of the Research Group of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease, Tübingen, 29.Sept.-1.Oct. 1981, 71, Hrsg. FAO, Rom, 1982.
- LOMBARD, M., 1983: Serological studies on Near East FMD strains of type O. Comparison with viruses of recent outbreaks in Europe. Report of the Session of the Research Group of the Standing Technical Committee of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease, Pirbright, 22-24 Sept. 1982, 21-23, Hrsg. FAO, Rom, 1983.
- LOMBARD, M., J. RAVIN, R. DUFOUR, M. DUPASQUIER, C. ROULET und A. REY, 1982: Appréciations des souches virales aphteuses par des méthodes biologiques et biochimiques. Proceeding of the 16th Conference of the International Office of Epizootics, September 1982, 273-290.
- LORENZ, R.J., 1962: Zur Statistik des Plaque-Testes. Arch.ges.Virusforsch. 12, 108-137.
- MACKOWIAK, C., J. FONTAINE, J. TERRE, C. STELLMANN, M. ROUMIANTZEFF und H.G. PETERMANN, 1966: Contrôle quantitatif du vaccin antiaphteux. Etude de la dose-effet et corrélation entre les doses vaccinales 50 p. 100 chez les cobayes et les bovidés. Bull.Off.int. Epiz. 65, 131-171.
- MAKOFF, A.J., C.A. PAYNTER, D.J. ROWLANDS und J.C. BOOTHROYD, 1982: Comparison of the amino acid sequence of the major immunogen from three serotypes of foot-and-mouth disease virus. Nucleic Acids Res. 10, 8285-8295.

- MAYR, A., G. EIBNER und B. MAYR-BIBRACK, 1984: Handbuch der Schutzimpfungen in der Tiermedizin.
Verlag Paul Parey, Berlin-Hamburg, 1984.
- McCAHON, D., A.M.Q. KING und J.W.I. NEWMAN, 1982: Rapid identification of virus isolates by electrofocussing of their induced proteins.
Proceedings of the 16th Conference of the International Office of Epizootics, Paris, 14-17 Sept. 1982, 245-254, Hrsg. OIE, Paris, 1982.
- McKERCHER, P.D. und A.R. GIORDANO, 1967: Foot-and-mouth disease in swine. I. The immune response of swine to chemically treated and non-treated foot-and-mouth disease virus.
Arch.ges.Virusforsch. 20, 39-53.
- McKERCHER, P.D. und H.L. BACHRACH, 1976: A foot-and-mouth disease vaccine for swine.
Can.J.comp.Med. 40, 67-74.
- MELOEN, R.H., D.J. ROWLANDS und F. BROWN, 1979: Comparison of the antibodies elicited by the individual structural proteins of foot-and-mouth disease and polio viruses.
J.gen.Virol. 45, 761-763.
- MELOEN, R.H., R.J. BRIAIRE, R.J. WOORTMEYER und D. VAN ZAANE, 1983: The main antigenic determinant detected by neutralizing monoclonal antibodies on the intact foot-and-mouth disease virus particle is absent from isolated VP1.
J.gen.Virol. 64, 1193-1198.
- MOHANTY, S.B. und S.K. DUTTA, 1981: Veterinary Virology.
Verlag Lea & Febinger, Philadelphia, 120-127.
- NABHOLZ, A., 1966: Die Maul- und Klauenseuche 1965-1966 in der Schweiz.
Schw.Arch.Tierheilkd. 108, 717-728.
- NICHOLLS, M.J., L. BLACK, M.M. RWEYEMAMU, J. GENOVESE, R. FERRARI, C.A. HAMMANT, E. DE SILVA und O. UMEHARA, 1984: The effect of maternally derived antibodies on the response of calves to vaccination against foot-and-mouth disease.
J.Hyg., Camb. 92, 105-116.
- OULDRIIDGE, J., P.V. BARNETT, N.R., PARRY, A. SYRED, M. HEAD und M.M. RWEYEMAMU, 1984: Demonstration of neutralizing

and non-neutralizing epitopes on the trypsin-sensitive site of foot-and-mouth disease virus.

J.gen.Virol. 65, 203-207.

PARRY, N.R., M.M. RWEYEMAMU und T.W.F. PAY, 1978: Studies on plaque variants of foot-and-mouth disease vaccine viruses.
Bull.Off.int.Epiz. 89, 929-943.

PAY, T.W.F. und M.J. PARKER, 1977: Some statistical and experimental design problems in the assessment of FMD vaccine potency.

Develop.biol.Standard. 35, 369-383.

PEREIRA, H.G., 1977: Subtyping of foot-and-mouth disease virus.
Develop.biol.Standard. 35, 167-174.

PEREIRA, H.G., 1981: Disease Monographs.

Virus Diseases of Food Animals, Volume II, 333-359, Hrsg. E.P.J. Gibbs, Verlag Academic Press, New York und London, 1981.

PEREZ-BERCOFF, R. (Hrsg.), 1978: The molecular biology of picornaviruses.

Verlag Plenum Press, New York und London.

PFAFF, E., M. MUSSGAY, H.O. BOHM, G.E. SCHULZ und H. SCHALLER, 1982: Antibodies against a preselected peptide recognise and neutralise foot-and-mouth disease virus.
EMBO J. 1, 869-874.

REKOSH, M.K., 1977: The molecular biology of picornaviruses.

In: The molecular biology of animal viruses, Vol. 1, Hrsg. D.P. Nayak, Verlag Marcel Dekker, 1977.

RENNER, F., 1925: Über die Dauer der passiven Immunität bei Maul- und Klauenseuche beim Meerschweinchen.
Münch.Tierärztl.Wschr. 76, 474

Report on the eradication of foot-and-mouth disease on the island of Funen and Zeland, Denmark 1982.

Published by the Danish Veterinary Service.

Report on a single case of foot-and-mouth disease on the island of Funen, Denmark, January 1983.

Published by the Danish Veterinary Service and the State Veterinary Institute for Virus Research.

ROBERTSON, B.H., D.M. MOORE, M.J. GRUBMAN und D.G. KLEID,

- 1983: Identification of an exposed region of the immunogenic capsid polypeptide VP1 on foot-and-mouth disease virus.
J.Virol. 46, 311-316.
- ROBERTSON, B.H., D.O. MORGAN und D.M. MOORE, 1984: Location of neutralizing epitopes defined by monoclonal antibodies generated against the outer capsid polypeptide VP1 of foot-and-mouth disease virus A₁₂.
Virus Res. 1, 489-500.
- ROBSON, K.J.H., J.R. Crowther, A.M.Q. KING und F. BROWN, 1979: Comparative biochemical and serological analysis of five isolates of a single serotype of foot-and-mouth disease virus.
J.gen.Virol. 45, 579-590.
- ROBSON, K.J.H., T.R. DOEL, B.M. GORMAN und F. BROWN, 1980: Biochemical aspects of variation in foot-and-mouth disease virus.
J.gen.Virol. 46, 179-193.
- RÖHRER, H. und A.F. OLECHNOWITZ, 1980: Maul- und Klauenseuche. Hrsg. H. Röhrer, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1980.
- ROLLE, M. und A. MAYR, 1984: Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre für Tierärzte, Biologen und Agrarwissenschaftler: Lehrbuch für Praxis und Studium.
Hrsg. A. Mayr, 5. Auflage, Enke Verlag, Stuttgart, 1984.
- ROWLANDS, D.J., D.V. SANGAR und F. BROWN, 1975: A comparative chemical and serological study of the full and empty particles of foot-and-mouth disease virus.
J.gen.Virol. 26, 227-238.
- RUECKERT, R.R., 1976: On the structure and morphogenesis of picornavirus.
Comprehensive Virology, Vol. 6, 131-213, Hrsg. H. Fraenkel-Conrat und R.R. Wagner, Verlag Plenum press, New York.
- RUMP, A., 1975: Charakterisierung einer avirulenten, stark Interferon induzierenden Mutante des Maul- und Klauenseuchevirus, Subtyp O₁ Lombardei, und Untersuchungen zur Interferoninduktion durch dieses Virus.
Inaug. Dissertation. Hannover.
- RWEYEMAMU, M.M. 1984: Antigenic variation in foot-and-mouth disease: studies based on the virus neutralization reaction.
J.biol.Standard. 12, 323-337.

- RWEYEMAMU, M.M., T.W.F. PAY und M.J. PARKER, 1977: Serological differentiation of foot-and-mouth disease virus strains in relation to selection of suitable vaccine viruses.
Dev.biol.Standard. 35, 205-214.
- RWEYEMAMU, M.M., J.C. BOOTH, M. HEAD und T.W.F. PAY, 1978: Microneutralization tests for the serological typing and subtyping of foot-and-mouth disease virus strains.
J.Hyg., Camb. 81, 107-123.
- RWEYEMAMU, M.M., G. TERRY und T.W.F. PAY, 1979: Stability and Immunogenicity of empty particles of foot-and-mouth disease virus.
Arch.Virol. 59, 69-79.
- RWEYEMAMU, M.M. und E.J. OULDRIDGE, 1982: Serological analysis of recent type O foot-and-mouth disease virus isolates from Europe.
Vet.Rec. 111, 163-165.
- RWEYEMAMU, M.M. und P.J. HINGLEY, 1984: Foot-and-mouth disease virus strains differentiation: analysis of the serological data.
J.biol.Standard. 12, 225-229.
- SANGAR, D.V., D.J. ROWLANDS, T.J.R. HARRIS und F. BROWN, 1977: Protein covalently linked to foot-and-mouth disease virus RNA.
Nature 268, 648-650.
- SANGAR, D.V., D.N. BLACK, D.J. ROWLANDS, T.J.R. HARRIS und F. BROWN, 1980: Location of the initiation site for protein synthesis on foot-and-mouth disease virus RNA by in vitro translation of defined fragments of the RNA.
J.Virol. 33, 59-68.
- SCHMIDT, S., 1938: Adsorption von Maul- und Klauenseuchevirus an Aluminiumhydroxyd unter besonderer Berücksichtigung der immunisierenden Eigenschaften der Virusadsorbate.
Z.Immunitätsforsch. 92, 392-409.
- SCHNEIDER, B., 1960: Antigenic differences between two A₅-strains of the foot-and-mouth disease virus.
Bull.Off.int.Epiz. 53, 876-884.
- SELLERS, R.F. und J. PARKER, 1969: Airbone excretion of foot-and-mouth disease virus.
J.Hyg., Camb. 67, 671-677.

- SELLERS, R.F., 1971: Quantitative aspects of the spread of foot-and-mouth disease.
Vet.Bull. 41, 431-439.
- DeSIMONE, F., E. BROCCHI, L. CAPUCCI und G.F. PANINA, 1983: Characterization of monoclonal antibodies to FMD virus: Preliminary results.
Session of the Research Group of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease, Lelystad, 20-22 Sept. 1983, 17-19, Hrsg. FAO, Rom, 1983.
- SOBRINO, F., M. DAVILA, J. ORTIN und E. DOMINGO, 1983: Multiple genetic variants arise in the course of replication of foot-and-mouth disease virus in cell culture.
Virology 128, 310-318.
- STOKER, M. und I. McPHERSON, 1964: Syrian hamster cell line BHK-21 and its derivatives.
Nature 203, 1355-1357.
- STROBBE, R., J. DEBECQ und J. LEUNEN, 1981: Elution and innocuity of FMD vaccines.
Session of the Research Group of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease, Tübingen, F.R.G., 29.Sept.-1.Oct. 1981. 43-45, Hrsg. FAO, Rom, 1982.
- STROHMAIER, K. und K.H. ADAM, 1976: Die Struktur des Virus der Maul- und Klauenseuche.
Zbl.Vet.med. B 23, 483-506.
- STROHMAIER, K., R. FRANZE und K.H. ADAM, 1982: Location and characterization of the antigenic portion of the FMDV immunizing protein.
J.gen.Virol. 59, 295-306.
- SUTMÖLLER, P. und A. VIEIRA, 1980: Relación de títulos de anticuerpos neutralizantes y la protección de bovinos al virus de la fiebre aftosa.
Bol.Centr.Panam.Fiebre Aftosa 39-40, 51-56.
- SUTMÖLLER, P., K. DE FREITAS COSTA und I. GOMES, 1980: Prueba de seroneutralización por microtecnica para fiebre aftosa: Cálculo de la expectativa porcentual de protección.
Bol.Centr.Panam.Fiebre Aftosa, 39-40, 31-36.
- THIEL, H.-J. und K. STROHMAIER, 1984: Neutralizing monoclonal

antibodies against FMDV.

Session of the Research Group of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease, Brescia, 26-28 June, 1984, 30-31, Hrsg. FAO, Rom, 1984.

TRAUB, E. und H. MÖHLMAN, 1946: Untersuchungen über immunologische Varianten der Typen A und B des Maul- und Klauenseuchevirus. Berl.Münch.Tierärztl.Wschr. 62, 1-5.

TRAUTMAN, R. und W.F. HARRIS, 1977: Modeling and computer simulation approach to the mechanism of foot-and-mouth disease virus neutralization assay. Scand.J.Immunol. 6, 831-841.

UBERTINI, B., NARDELLI, A. DAL PRATO, G. PANINA und G. SANTERO, 1964: Subtype variation of foot-and-mouth disease virus and vaccination. Wien.Tierärztl.Wschr. 51, 99-110.

VALLEE, H. und H. CARRE, 1922: Sur la pluralité des virus aphteux. Compt.rend.hebd.acad.sci. 174, 207-208.

VALLEE, H., H. CARRE und P. RINJARD, 1925: Sur l'immunisation antiaphteuse. Bull.Soc.cent.Méd.vet. 78, 297.

WALDMANN, O., 1930: Über Maul- und Klauenseuche. Proceeding of 11th Int.Vet.Cong. 2, 37-59.

WALDMANN, O. und K. KÖBE, G. PYL, 1937: Die aktive Immunisierung des Rindes gegen Maul- und Klauenseuche mittels Formolimpfstoff. Zbl.Bakt., I. Orig. 138, 401-412.

WALDMANN, O. und K. TRAUTWEIN, 1922: Über Infektiosität und Immunität bei Maul- und Klauenseuche. Zbl. Bakt. I. Orig. 89, 162-166.

WALDMANN, O. und K. TRAUTWEIN, 1923: Versuche zur aktiven Immunisierung gegen Maul- und Klauenseuche. Arch.Tierheilkd. 50, 229.

WALDMANN, O. und K. TRAUTWEIN, 1923: Die Maul- und Klauenseucheimmunität nach künstlicher und spontaner Infektion sowie nach simultaner Impfung. Zbl.Bakt. I. Orig. 90, 448-457.

WALDMANN, O. und K. TRAUTWEIN, 1926: Experimentelle

- Untersuchungen über die Pluralität des Maul- und
Klauenseuchevirus. Berl.Münch.Tierärztl.Wschr. 42, 569-570.
- DeWACHTER, R. und W. FIERIS, 1972: Preparative two-dimensional
polyacrylamide gel electrophoresis of ³²P-labelled RNA.
Anal.Biochem. 49, 184-197.
- WARDLEY, R.C., W.G. CHAPMAN und A.J.M. GARLAND, 1979: A
blastogenic test for foot-and-mouth disease.
J.Hyg., Camb. 83, 507-512.
- WILD, T.F. und F. BROWN, 1968: A study of the physical properties
of the immunising antigen of foot-and-mouth disease virus and the
effect of various inactivating agents on its structure.
Arch.ges.Virusforsch. 24, 86-103.
- WITTMANN, G., 1964: Subtypen des Maul- und Klauenseuchevirus vom
Typ O: Ihre antigenen und immunologischen Beziehungen
zueinander.
Zbl.Bakt.I.Orig. 194, 1-25.
- WITTMANN, G., 1966: Die antigenen und immunologischen Eigenschaften
und Beziehungen von A-Subtypen des Maul- und
Klauenseuchevirus. I. Nach Impfung von Meerschweinchen mit
aktivem Virus. II. Nach Impfung von Meerschweinchen mit
Formalin-Adsorbatimpfstoff.
Zbl.Vet.Med. B 13, 225-238, 321-333.
- WITTMANN, G., 1972a: Immunität und Immunisierung gegen Maul- und
Klauenseuche (MKS)-Virus.
Berl. Münch.Tierärztl.Wschr. 85, 281-284.
- WITTMANN, G., 1972b: Frühe Stadien der Immunität nach Impfung von
Schweinen mit einer Maul- und Klauenseuche
DEAE-Dextran-Vakzine.
Zbl.Vet.Med. B 19, 406-411.
- WITTMANN, G. und A. MAYR, 1962: Ein Beitrag zum Problem der
Variantendiagnose beim Maul- und Klauenseuche-Virus des Typs O.
Mh.Tierheilkd. 14, 51-64.

Herrn Präs. und Prof.Dr.G.Wittmann möchte ich herzlich danken für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in der Bundesforschungsanstalt für Viruserkrankungen der Tiere, sowie für die mir ständig gewährte Unterstützung und Diskussionsbereitschaft.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dir. und Prof.Dr.R.Ahl für die Überlassung des Themas und für die hilfreiche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

An dieser Stelle möchte ich auch Herrn Prof.Dr.Dr.h.c.mult.A.Mayr danken, daß die Arbeit zum ordentlichen Promotionsverfahren im Fachbereich Tiermedizin der Universität München übernommen wurde.

Für die Hilfe bei der Durchführung der Versuche zur Isoelektrofokussierung möchte ich Herrn Dir. und Prof.Dr.H.D.Matheka und Herrn E.Schlotterer herzlich danken, ebenso Herrn Wiss. Oberrat Dr.H.-J.Thiel für die Überlassung von monoklonalen Antikörpern gegen MKS-Virus und Herrn Wiss.Dir.Dr.F.Weiland für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Mein Dank gilt ebenso Frau Ruth Blum und Frau Hiltrud Krebs für Ihre menschliche und fachliche Hilfe.

Frau Claudia Dicker, Herrn Peter Schröter und Herrn Roland Straub danke ich für die Unterstützung bei der Fertigstellung des Manuskriptes, der Fotografien und der Zeichnungen.

Lebenslauf

14. Jan. 1958 Als Tochter des Hans Rudolf A. Keller
Maschinenbauingenieur und seiner Frau
Maria Mathilde, geb. Theobald, in
Schweinfurt geboren
- Ab Juni 1963 Wohnort in Sao Paulo/Brasilien
- Feb. 1964 bis Dez. 1976 Besuch der Vorschule, Grundstufe,
Mittelstufe und Oberstufe am Colégio
Humbold in Sao Paulo/Brasilien
- Juli 1977 bis Jan. 1982 Studium der Tiermedizin an der Fakultät
für Agrarwissenschaften und Veterinär-
medizin der staatl. Universität "Júlio de
Mesquita Filho" in Jaboticabal,
Sao Paulo/Brasilien
15. Jan. 1982 Abschluß mit dem Diplom als Tierärztin
1. Sept. 1982 Approbation als Tierärztin vom
Bayerischen Staatsministerium des Innern
1. Juli 1983 bis
10. April 1985 Anfertigung der Dissertation an der
Bundesforschungsanstalt für
Viruskrankheiten der Tiere in Tübingen
1. März 1983 bis
29. Febr. 1984 und
1. Juli bis 31. Dez. 1984 Wissenschaftliche Angestellte an der
Bundesforschungsanstalt für
Viruskrankheiten der Tiere in Tübingen
1. März 1984 bis
30. Juni 1984 und
1. Jan. 1985 bis
Juli 1985 Volontärin an der
Bundesforschungsanstalt für
Viruskrankheiten der Tiere in Tübingen
30. Sept. 1985 bis
30. Sept. 1986 2-semestriges Studium der Fächer: Allge-
meine Infektions- und Seuchenlehre, Staat-
liche Tierseuchenbekämpfung und Parasito-
logie mit anschließender Kenntnisprüfung
an der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München.

